

Promotor zur epidermisspezifischen Transgenexpression in Pflanzen

5 Die vorliegende Erfindung betrifft Promotorregionen, unter deren Kontrolle
Transgene in Pflanzen epidermisspezifisch exprimiert werden können. Weiterhin
betrifft die Erfindung rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die diese
Promotorregionen umfassen und transgene Pflanzen und Pflanzenzellen, die mit
diesen Nukleinsäuremolekülen transformiert wurden, sowie Verfahren zu deren
10 Herstellung. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung Nukleinsäuremoleküle
umfassend einen erfindungsgemäßen Promotor und Nukleinsäuresequenzen bzw.
Transgene, die Pathogenresistenz vermitteln können sowie mit diesen Nukleinsäure-
molekülen transformierte Pflanzen und Pflanzenzellen und Verfahren zu deren
Herstellung.

15 Als Promotoren werden allgemein diejenigen DNA-Bereiche eines Gens bezeichnet,
die stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes liegen und durch die der
Initiationspunkt und die Initiationshäufigkeit der Transkription und somit die
Expressionsstärke und das Expressionsmuster des kontrollierten Gens festgelegt
20 werden. An die Promotoren binden die RNA-Polymerase und spezifische, die RNA-
Polymerase aktivierende Transkriptionsfaktoren, um die Transkription zusammen
mit dem basalen Transkriptionskomplex zu initiieren. Die Wirksamkeit der Promo-
toren wird häufig durch zusätzliche DNA-Sequenzen, die Enhancer-Sequenzen,
gesteigert und reguliert, deren Position im Gegensatz zu der der Promotoren nicht
25 festgelegt ist. Diese regulatorischen Elemente können stromaufwärts, stromabwärts
oder in einem Intron des zu exprimierenden Gens liegen.

In der rekombinanten DNA-Technologie werden Promotoren in Expressionsvektoren
eingesetzt, um die Expression eines Transgens zu steuern, das in der Regel nicht das
30 natürlicherweise durch den Promotor regulierte Gen ist. Dabei kommt es wesentlich
auf die Spezifität des Promotors an, die bestimmt, zu welchem Zeitpunkt, in welchen
Gewebetypen und in welcher Intensität ein gentechnisch übertragenes Gen
exprimiert wird.

BEST AVAILABLE COPY

In der Pflanzenzucht wird die rekombinante DNA-Technologie häufig eingesetzt, um bestimmte nützliche Eigenschaften auf Nutzpflanzen zu übertragen, was zu einem höheren Ertrag, z. B. durch erhöhte Pathogenresistenz, oder zu verbesserten Eigenschaften der Ernteprodukte führen soll. Dabei ist es häufig wünschenswert, dass das übertragene Gen nicht ubiquitär exprimiert wird, sondern nur in den Geweben, in denen die Transgenaktivität gewünscht wird, da sich die Anwesenheit des Transgenprodukts in manchen Geweben negativ auf normale physiologische Prozesse auswirken kann. So konnte etwa gezeigt werden, dass die Überexpression einer anionischen Peroxidase unter der Kontrolle des ubiquitär wirkenden 35S-Promotors zum Welken von transgenen Tabakpflanzen führt, weil weniger Wurzelwachstum stattfindet und sich daher auch weniger Wurzelmasse bildet (Lagrimini et al. (1997) The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. Plant Mol Biol. 33 (5), S. 887-895). Die Überexpression der spi2-Peroxidase unter der Kontrolle des ebenfalls ubiquitär wirkenden Ubiquitin-Promotors führt zu einer reduzierten Epicotylbildung und einem reduzierten Längenwachstum verglichen mit Kontrollpflanzen (Elfstrand, M. et al. (2001) Overexpression of the endogenous peroxidase-like gene spi 2 in transgenic Norway spruce plants results in increased total peroxidase activity and reduced growth. Plant Cell Reports 20 (7), S. 596-603). Abgesehen von negativen Effekten auf physiologische Prozesse soll in der Resistenzzüchtung häufig vermieden werden, dass das Transgenprodukt auch in den geernteten Pflanzenteilen vorliegt.

Deshalb wurden in den vergangenen Jahren Promotoren isoliert, die entweder gewebespezifisch oder induzierbar wirken. Zu den gewebespezifischen Promotoren gehören etwa samen-, knollen- und fruchtspezifische Promotoren. Die induzierbaren Promotoren können beispielsweise durch chemische Induktion, durch Lichtinduktion oder andere Stimuli aktiviert werden.

Es ist auch wünschenswert, die Genexpression spezifisch in der Epidermis zu modulieren. Die Epidermis stellt das Abschlussgewebe der oberirdischen Organe höherer Pflanzen dar. Als solches bestehen die Aufgaben der Epidermis darin, einerseits den Wasser- und Stoffaustausch der Pflanze zu ermöglichen und
5 andererseits das Eindringen von Pathogenen in die Pflanze zu verhindern. Durch eine veränderte Genexpression in der Epidermis mit Hilfe geeigneter Promotoren und von ihnen gesteuerter Gene könnten diese Funktionen gezielt moduliert werden.
In dikotyledonen Pflanzen wurden epidermisspezifische Promotoren bereits beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass der Promotor des CER6- (CUT1-) Gens
10 aus Arabidopsis, das für ein kondensierendes Enzym bei der Wachssynthese kodiert, die epidermisspezifische Expression eines β -Glucuronidase-Reportergens bewirken kann (Hooker et al. (2002), Significance of the expression of the CER6 condensing
enzyme for cuticular wax production in Arabidopsis, Plant Physiol. 129(4), S. 1568-
1580; Kunst et al. (2000), Expression of the wax-specific condensing enzyme CUT1
15 in Arabidopsis, Biochem. Soc. Trans. 28(6), S. 651-654).

Jedoch ist es bisher nicht gelungen, geeignete epidermisspezifische Promotoren in monokotyledonen Pflanzen, die sich für die Expression von Transgenen in
Monokotyledonen, insbesondere Poaceen (Süßgräsern), besonders gut eignen, zu
20 identifizieren. Deshalb wurden bisher konstitutive Promotoren wie der Ubiquitin-Promotor aus Mais verwendet, um Proteine in der Epidermis zu exprimieren (siehe z. B. Oldach et al. (2001), Heterologous expression of genes mediating enhanced
fungal resistance in transgenic wheat, Mol Plant Microbe Interact. 14(7), S. 832-
838). Dies kann aber, wie oben beschrieben, zu unerwünschten Nebeneffekten bei
25 den transgenen Pflanzen aufgrund der Anwesenheit des Transgenprodukts in anderen Geweben bzw. Organen als der Epidermis führen.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, Mittel bereitzustellen, die eine
epidermisspezifische Genexpression in Monokotyledonen, bevorzugt in
30 Getreidepflanzen, ermöglichen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen charakterisierten Ausführungsformen.

- 5 Somit betrifft die vorliegende Erfindung eine Promotorregion mit Spezifität für die pflanzliche Epidermis, umfassend eine erste, aus dem Promotor des Gens Glutathion-S-Transferase A1 (GSTA1) stammende Sequenz, und eine zweite, aus dem Intron des Gens WIR1a stammende Sequenz. GSTA1 bezieht sich auf Gene, wie sie in
10 Dudler et al. (1991), A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione-S-transferases, Mol. Plant Microbe Interact. 4(1), S. 14-18 beschrieben sind. Insbesondere handelt es sich bei diesen Genen um Gene aus Weizen, es kann sich aber auch um homologe Gene aus anderen Getreidepflanzen, vor allem Gerste, mit vergleichbarem Expressionsmuster und ähnlichem Genprodukt handeln. WIR1a bezeichnet Gene, wie sie in Bull et al. (1992), Sequence and expression of a wheat
15 gene that encodes a novel protein associated with pathogen defense, Mol. Plant Microbe Interact. 5(6), S. 516-519, beschrieben sind.

Bevorzugt handelt es sich bei der ersten Sequenz um SEQ ID Nr. 1 und bei der zweiten Sequenz um SEQ ID Nr. 2.

20

Zwischen der ersten und der zweiten Sequenz können weitere, untranslatierte Sequenzen liegen, die eine Länge von 10bp bis 1000bp, bevorzugt von 20bp bis 800bp, besonders bevorzugt von 30bp bis 500bp und am meisten bevorzugt zwischen 40bp und 300bp aufweisen.

25

Besonders bevorzugt handelt es sich bei der erfindungsgemäßen Promotorregion um eine Promotorregion, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Promotorregionen, die die unter SEQ ID Nr. 3 angegebene Nukleinsäuresequenz umfassen;

- 5 -

b) Promotorregionen, die einen funktionalen Teil der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz umfassen oder

c) Promotorregionen, die eine Sequenz aufweisen, die unter stringenten Bedingungen

5 mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz hybridisiert.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter einer Promotorregion eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die die zur Expression einer kodierenden Sequenz (Transgen) notwendigen regulatorischen Sequenzen umfasst. Regulatorische Sequenzen bilden denjenigen Teil eines Gens, der die Expression einer kodierenden Sequenz bestimmt, also vor allem das Expressionsniveau und -muster. Die regulatorischen Sequenzen besitzen mindestens ein Sequenzmotiv, an das spezifische Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase binden, zum

10 Transkriptionskomplex assemblieren und die Transkription der von der Promotorregion kontrollierten Nukleinsäuresequenz wirksam initiieren.

15

Die erfindungsgemäßen Promotorregionen basieren auf der Beobachtung, dass durch Fusion des Promotors des GSTA1-Gens aus Weizen mit intronischen Sequenzen des WIR1a-Gens aus Weizen Promotoren mit neuen Eigenschaften hergestellt werden können.

20

In transienten Reporterassays in Weizenblättern mit einem β -Glucuronidase-(GUS)-Gen aus *E. coli* als Reporter gen wurden verschiedene Kombinationen des WIR1a-Promotors und -Introns und des GST-Promotors getestet. Es zeigte sich überraschenderweise, dass GST-Promotor und WIR1a-Intron einen synergistischen Effekt auf die Reporter gen-Aktivität ausüben. Die Steigerung der transkriptionellen Aktivität war vergleichbar mit der durch den ubiquitär exprimierten 35S-Promotor erzielten transkriptionellen Aktivität.

25

30

- 6 -

Unter dem Begriff „epidermisspezifisch“ wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung verstanden, dass eine unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorregion stehende Nukleinsäuresequenz in der Spross-epidermis von Pflanzen exprimiert wird. Insbesondere ist Epidermisspezifität im Sinne der vorliegenden

5 Erfindung auch dann gegeben, wenn die erfindungsgemäße Promotorregion die Expression eines Fremdgens in der Epidermis im Vergleich zu anderen Zelltypen begünstigt und in der Epidermis eine signifikant, wie mindestens 2-fach, bevorzugt mindestens 5-fach und besonders bevorzugt mindestens 10- und am meisten bevorzugt 50-fach gegenüber anderen Zelltypen erhöhte Expression bewirkt. Die

10 Expressionshöhe kann mit üblichen in situ-Nachweistechiken bestimmt werden.

Der Begriff „pflanzliche Epidermis“ ist dem Fachmann geläufig. Ergänzende Informationen sind in jedem Pflanzenanatomie- oder -physiologiebuch zu finden, wie etwa in Strasburger, Lehrbuch der Botanik, 35. Auflage 2002, Spektrum

15 Akademischer Verlag.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass eine Promotorregion, die sowohl regulatorische Sequenzen aus dem GSTA1-Gen aus Weizen als auch Intron-Sequenzen aus dem WIR1a-Gen aus Weizen umfasst, eine epidermisspezifische

20 Expression einer unter ihrer Kontrolle stehenden kodierenden Nukleinsäuresequenz bewirkt.

Neben einer Promotorregion, die die unter SEQ ID Nr. 3 dargestellten Nukleinsäuresequenzen aufweist, betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotorregionen, die

25 die funktionalen Teile dieser Sequenz aufweisen und die in Pflanzen eine epidermisspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten kodierenden Nukleinsäuresequenz bewirken.

Unter einem „funktionalen Teil“ werden in diesem Zusammenhang Sequenzen

30 verstanden, an die der Transkriptionskomplex trotz leicht abweichender

- 7 -

Nukleinsäuresequenz noch binden und epidermisspezifische Expression bewirken kann. Funktionale Teile einer Promotorsequenz umfassen auch solche Promotorvarianten, deren Promotoraktivität, verglichen mit dem Wildtyp, abgeschwächt oder verstärkt ist. Unter einem funktionalen Teil versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Varianten der in SEQ ID Nr. 3 angegebenen Sequenz der Promotorregion. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen und/oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Funktionale Teile der Promotorregionen umfassen im Rahmen der vorliegenden Erfindung natürlich vorkommende Varianten der SEQ ID Nr. 3 sowie künstliche, z. B. durch chemische Synthese erhaltene Nukleotidsequenzen.

Der verwendete Promotor enthält in jedem Fall eine TATA-Box (Positionen 2163 bis 2169 in SEQ ID Nrn. 1 und 3) und bevorzugt auch zwei CAAT-Boxen (Positionen 1047 bis 1051 bzw. 1895 bis 1899 in SEQ ID Nrn. 1 und 3). Weiterhin ist mindestens eines, bevorzugt mindestens zwei und drei, besonders bevorzugt mindestens vier, fünf und sechs, und am meisten bevorzugt sieben und acht der folgenden Sequenzmotive im Promotor enthalten:

- a) GTGGGGG
- 20 b) ACGTGGA
- c) TCCACCT
- d) TATCCAT
- e) CATGCATG
- f) TGTAAG
- 25 g) CCTACCA
- h) AATAGTA

Bevorzugt liegen die Sequenzmotive an den Positionen, die den folgenden Positionen in SEQ ID Nrn. 1 und 3 entsprechen:

30

- 8 -

- a) 185-191 und 217-223bp
 - b) 455-461bp
 - c) 508-514bp
 - d) 564-570bp
 - 5 - e) 1514-1521bp
 - f) 1520-1526bp
 - g) 1569-1575bp
 - h) 1610-1616bp
- 10 Gemessen werden kann die Promotoraktivität von Varianten der Promotorregion mit Hilfe von Markergenen, deren kodierende Sequenz unter der Kontrolle der zu untersuchenden Promotorregion steht. Geeignete Markergene sind beispielsweise das β -Glucuronidase-(GUS)-Gen aus *E. coli*, ein Fluoreszenzgen wie etwa das Green-Fluorescence-Protein (GFP)-Gen aus *Aequoria victoria*, das Luziferase-Gen aus
- 15 *Photinus pyralis* oder das β -Galaktosidase-(lacZ)-Gen aus *E. coli*. Die absolute Promotoraktivität wird bestimmt durch Vergleich mit einer Wildtyp-Pflanze. Die Gewebe- bzw. Zellspezifität lässt sich leicht durch Vergleich der Expressionsraten der oben genannten Markergene in den jeweiligen Geweben bzw. Zellen bestimmen.
- 20 Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls Promotorregionen mit einer Nukleinsäuresequenz, die mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Der Begriff „Hybridisierung unter stringenten Bedingungen“ bedeutet im Zusammenhang dieser Erfindung, dass die Hybridisierung *in vitro* unter Bedingungen durchgeführt wird,
- 25 die stringent genug sind, um eine spezifische Hybridisierung zu gewährleisten. Solche stringenten Hybridisierungsbedingungen sind dem Fachmann bekannt und können der Literatur entnommen werden (Sambrook et al. (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Allgemein bedeutet "spezifisch hybridisieren", dass ein Molekül unter stringenten Bedingungen präferenziell an eine bestimmte Nukleotidsequenz bindet, wenn diese Sequenz in einem komplexen Gemisch von (z. B. Gesamt-) DNA oder RNA vorliegt. Der Begriff „stringente Bedingungen“ steht allgemein für Bedingungen, unter denen

5 eine Nukleinsäuresequenz präferenziell an ihre Zielsequenz hybridisieren wird, und zu einem deutlich geringeren Ausmaß oder gar nicht an andere Sequenzen. Stringente Bedingungen sind z. T. Sequenz-abhängig und werden unter verschiedenen Umständen unterschiedlich sein. Längere Sequenzen hybridisieren spezifisch bei höheren Temperaturen. Im Allgemeinen werden stringente

10 Bedingungen so ausgewählt, dass die Temperatur etwa 5°C unter dem thermischen Schmelzpunkt (T_m) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und einem definierten pH liegt. Die T_m ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke, pH und Nukleinsäurekonzentration), bei der 50% der zu der Zielsequenz komplementären Moleküle zu der Zielsequenz im Gleichgewichtszustand

15 hybridisieren. Typischerweise sind stringente Bedingungen solche, bei denen die Salzkonzentration mindestens ungefähr 0,01 bis 1,0 M Natriumionen-Konzentration (oder ein anderes Salz) bei einem pH zwischen 7,0 und 8,3 beträgt und die Temperatur mindestens 30 °C für kurze Moleküle (also z. B. 10-50 Nukleotide) beträgt. Zusätzlich können stringente Bedingungen durch Zugabe destabilisierender

20 Agenzien, wie beispielsweise Formamid, erreicht werden.

Geeignete stringente Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise auch beschrieben in Sambrook et al., vide supra. So kann die Hybridisierung etwa unter den folgenden Bedingungen stattfinden:

- 25 - Hybridisierungspuffer: 2x SSC, 10x Denhardt's Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA; Verhältnis 1:1:1), 0,1% SDS, 5mM EDTA, 50mM Na_2HPO_4 , 250µg/ml Heringssperma-DNA; 50µg/ml tRNA oder 0,25M Natriumphosphatpuffer pH 7,2, 1mM EDTA, 7% SDS bei einer Hybridisierungstemperatur von 65°C bis 68°C

- 10 -

- Waschpuffer: 0,2x SSC, 0,1% SDS bei einer Washtemperatur von 65°C bis 68°C

Vorzugsweise weisen derartige Promotorvarianten eine Sequenzidentität von
5 mindestens 50%, bevorzugt mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 90%
und am meisten bevorzugt mindestens 95% zu der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen
Promotorsequenz oder Teilen davon auf, bezogen auf die gesamte in SEQ ID Nr. 3
gezeigte DNA-Sequenz. Vorzugsweise wird die Sequenzidentität derartiger
Promotorsequenzen durch Vergleich mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen
10 Nukleinsäuresequenz bestimmt. Wenn zwei unterschiedlich lange
Nukleinsäuresequenzen miteinander verglichen werden, bezieht sich die
Sequenzidentität vorzugsweise auf den prozentualen Anteil der Nukleotidreste der
kürzeren Sequenz, die identisch sind mit den entsprechenden Nukleotidresten der
längeren Sequenz.
15 Sequenzidentitäten werden üblicherweise über verschiedene Alignment-Programme,
wie z. B. CLUSTAL festgestellt. Allgemein stehen dem Fachmann zur Bestimmung
der Sequenzidentität geeignete Algorithmen zur Verfügung, z. B. auch das
Programm, das unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (z. B. der Link „Standard
20 nucleotide-nucleotide BLAST [blastn]“) zugänglich ist.

Die oben für SEQ ID Nr. 3 angegebenen prozentualen Identitätsgrade gelten ebenso
für die in SEQ ID Nrn. 1 und 2 gezeigten ersten und zweiten Sequenzen der
erfindungsgemäßen Promotorregion.
25 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist die erfindungsgemäße
Promotorregion die gesamte unter SEQ ID Nr. 3 angegebene Sequenz von 2552
Nukleotiden auf.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch chimäre Gene aus der erfindungsgemäßen Promotorregion und einer kodierenden Sequenz, deren Expression, die natürlicherweise nicht durch die erfindungsgemäßen Promotorregion reguliert wird, im chimären Gen durch die erfindungsgemäße Promotorregion reguliert wird, in
5 operativer Verknüpfung sowie rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die diese chimären Gene enthalten.

Der Begriff „Nukleinsäuresequenz, deren Expression durch die erfindungsgemäße Promotorregion reguliert wird“ bedeutet, dass die Expression der
10 Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorregion in den Zellen, in denen die Promotorregion aktiv ist, um mindestens den Faktor fünf, bevorzugt mindestens den Faktor 10 und besonders bevorzugt mindestens den Faktor 50 gegenüber Wildtyp-Zellen gesteigert werden kann.

15 Bei der Nukleinsäuresequenz, deren Expression durch die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz reguliert wird, kann es sich um die kodierende Region eines Transgens handeln, z. B. eines Resistenzgens, dessen Genprodukt in der Epidermis erwünscht ist. Durch die Expression des Transgens kann der Gehalt des von ihm kodierten Genprodukts mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um den
20 Faktor 5, besonders bevorzugt mindestens um den Faktor 10 und am meisten bevorzugt mindestens um den Faktor 50 erhöht werden.

Die erfindungsgemäße Promotorregion kann aber auch in RNAi-Konstrukten zur RNA-Interferenz eingesetzt werden, um das epidermisspezifische Silencing
25 bestimmter Gene zu erreichen, deren Genprodukte in der Epidermis nicht oder in geringerem Ausmaß als üblich anwesend sein sollen. Letzteres kann natürlich auch mit klassischen antisense- oder Kosuppressionskonstrukten unter Einsatz der erfindungsgemäßen Promotorregionen erreicht werden. Die Expression des endogenen Gens wird durch die Silencing-Konstrukte um mindestens 50%,

bevorzugt um mindestens 70%, besonders bevorzugt um mindestens 90% und besonders bevorzugt um mindestens 95% verringert.

In einem Konstrukt, das zur RNA-Interferenz verwendet werden soll, liegen
5 üblicherweise palindromische DNA-Sequenzen vor, die nach der Transkription doppelsträngige RNA bilden. Diese doppelsträngige RNA wird durch das Dicer-Enzym zu kürzeren RNA-Stücken prozessiert, die an eine endogene RNA binden und deren Abbau mit Hilfe des RISC (RNA-induced silencing complex) bewirken (Hannon (2002) RNA interference, Nature, Bd. 418, S. 244-251).

10 Der Effekt der Gen-Silencing-Konstrukte auf die Expression des endogenen Gens kann mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Methoden nachgewiesen werden, die dem Fachmann wohl bekannt sind. So stehen zur Untersuchung des RNA-Levels Northern-Blot- und RT-PCR-Verfahren zur Verfügung, das Protein kann durch
15 Western-Blot-Analysen, Immunfluoreszenzen oder, sofern es sich bei dem Protein um ein Enzym handelt, Enzymassays nachgewiesen werden.

Unter dem Begriff „Transgen“ werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung diejenigen Gene zusammengefasst, deren Genprodukte in der Epidermis
20 bereitgestellt werden sollen, bzw. beim Gen-Silencing unterdrückt werden sollen.

Bei der Nukleinsäuresequenz, deren Expression unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors steht, handelt es sich bevorzugt um eine
Nukleinsäuresequenz, die Pathogenresistenz vermittelt, da die Epidermis die erste
25 Barriere darstellt, die von einem Pathogen beim Eindringen in die Pflanze überwunden werden muss.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff „rekombinantes Nukleinsäuremolekül“ ein Vektor verstanden, der ein erfindungsgemäßes chimäres
30 Gen oder eine erfindungsgemäße Promotorregion enthält und die promotor-

- abhängige Expression der unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorregion stehenden Nukleinsäuresequenz in Pflanzenzellen und Pflanzen bewirken kann. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nukleinsäuremolekül zusätzlich transkriptionelle
- 5 Terminationssequenzen. Unter „transkriptionellen Terminationssequenzen“ werden dabei DNA-Sequenzen verstanden, die am Stromabwärts-Ende einer kodierenden Sequenz liegen und die RNA-Polymerase zum Stoppen der Transkription veranlassen.
- 10 Weiterhin betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit epidermisspezifischer Expression einer durch die erfindungsgemäße Promotorregion regulierten Nukleinsäuresequenz, umfassend die Schritte:
- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls, in der die erfindungsgemäße Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer
 - 15 kodierenden Sequenz vorliegt,
 - b) Übertragung des Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
 - c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.
- 20 Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen bzw. deren Zellen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E. coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Das chimäre Gen kann an einer passenden
- 25 Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird dann für die Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E. coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend geerntet und lysiert, und das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethoden zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen
- 30 Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiolo-

- 14 -

gische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und daraus gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden.

- 5 Wie bereits erwähnt, stehen für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln kann. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als
- 10 Transformationsmedium, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Einbringung von DNA mittels biolistischer Methoden sowie weitere Möglichkeiten, die bereits seit mehreren Jahren gut etabliert sind und zum üblichen Repertoire des Fachmanns in der pflanzlichen Molekularbiologie bzw. Pflanzenbiotechnologie
- 15 gehören. Die biolistische Gentransfermethode wird vor allem bei monokotyledonen Pflanzen verwendet. Hier findet der Fachmann nützliche Informationen zur Durchführung z.B. in Vasil et al. (1992) Bio/Technology, 10, S. 667-674; Vasil et al. (1993) Bio/Technology, 11, S. 1153-1158; Nehra et al. (1994) Plant J. 5, S. 285-297; Becker et al. (1994) Plant J., 5, S. 299-307; Altpeter et al. (1996) Plant Cell Reports
- 20 16, S. 12-17; Ortiz et al. (1996) Plant Cell Reports 15, S. 877-81; Rasco-Gaunt et al. (2001) J. Exp. Bot. 52; S. 865-874.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden per se keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Ähnliches gilt

25 für den direkten Gentransfer. Es können einfache Plasmide, wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden.

Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens empfehlenswert. Dem Fachmann

sind die gängigen Selektionsmarker bekannt, und es stellt für ihn kein Problem dar, einen geeigneten Marker auszuwählen.

Je nach Einführungsmethode der gewünschten Gene in die Pflanzenzelle können
5 weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Wird z.B. zur Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muss mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der im Ti- bzw. Ri-Plasmid enthaltenen T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden. Werden zur Transformation Agrobakterien verwendet, muss die
10 einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA
15 notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können allerdings nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren dagegen können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker, welche von
20 der rechten und linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden. Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid enthalten, welches das chimäre Gen innerhalb der T-DNA trägt, welche in die Pflanzenzelle übertragen wird. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von
25 Pflanzenzellen verwendet. Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in allseits bekannten Übersichtsartikeln und Handbüchern zur Pflanzentransformation beschrieben worden. Für monokotyledone Pflanzen müssen für einen effektiven Agrobakterium-vermittelten Gentransfer abgewandelte Protokolle angewandt werden, wie sie etwa in
30 Cheng et al. (1997) Plant Physiol. 115, S. 971-980; Khanna and Daggard (2003)

Plant Cell Reports 21, S. 429-436; Wu et al. (2003) Plant Cell Reports 21, S. 659-668; Hu et al. (2003) Plant Cell Reports 21, S. 1010-1019, beschrieben sind. Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden.

10

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, Methotrexat, Glyphosat, Streptomycin, Sulfonylharnstoff, Gentamycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuell gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten. Hierzu sind auch alternative Marker geeignet, wie nutritive Marker oder Screeningmarker (wie GFP, green fluorescent protein). Selbstverständlich kann auch vollkommen auf Selektionsmarker verzichtet werden, was allerdings mit einem ziemlich hohen Screeningbedarf einhergeht. Falls markerfreie transgene Pflanzen erwünscht sind, stehen dem Fachmann auch Strategien zur Verfügung, die eine nachträgliche Entfernung des Markergens erlauben, z.B. Cotransformation oder Sequenz-spezifische Rekombinasen.

25

Die Regeneration der transgenen Pflanzen aus transgenen Pflanzenzellen erfolgt nach üblichen Regenerationsmethoden unter Verwendung bekannter Nährmedien. Die so erhaltenen Pflanzen können dann mittels üblicher Verfahren, einschließlich molekularbiologischer Methoden, wie PCR, Blot-Analysen, auf Anwesenheit und

30

Gewebespezifität der eingeführten Nukleinsäuresequenz, deren Expression von dem erfindungsgemäßen Promotor kontrolliert wird, bzw. der von ihr beeinflussten endogenen RNAs und Proteine untersucht werden.

- 5 Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen, die eine durch die erfindungsgemäße Promotorregion regulierte Nukleinsäuresequenz enthalten und diese epidermisspezifisch exprimieren.

- Bei den erfindungsgemäßen Pflanzen handelt es sich bevorzugt um
- 10 Monokotyledonen, insbesondere Getreidepflanzen wie Roggen, Mais und Hafer, besonders bevorzugt um Weizen oder Gerste, sowie transgene Teile dieser Pflanzen und deren transgenes Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze. Aber auch für andere Poaceen (Süßgräser) wie z. B. Futtergräser kann die
- 15 erfindungsgemäße Promotorregion zur Herstellung entsprechender Pflanzen mit epidermisspezifischer Expression von Transgenen eingesetzt werden.

- Unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen, epidermisspezifischen Promotors können Gene für die Produktion epikutikulärer Wachse exprimiert werden, um die
- 20 Trockenheitstoleranz der Pflanzen zu erhöhen. Außerdem können unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors Gene für die Produktion von Anthocyanen oder anderen UV-absorbierenden Substanzen zur Erhöhung der UV-Resistenz exprimiert werden. Wie oben bereits ausgeführt, werden bevorzugt Pathogen-Resistenzgene unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors exprimiert.

25

Als Pflanzenpathogene werden unter anderem Bakterien, Viren und Pilze bezeichnet, die Pflanzen infizieren und dadurch den Stoffwechsel der Pflanze negativ beeinflussen.

Zu diesen Pflanzenpathogenen gehören Pilze, die bei Getreidepflanzen wie Weizen und Gerste unter anderem die Krankheiten Echter Mehltau und Halmbruchkrankheit auslösen. Diese Krankheiten können abhängig von der Befallsstärke erhebliche Ertragsverluste (bis zu 50%) verursachen.

5

Traditionell werden die oben genannten sowie weitere pflanzliche Pilzerkrankungen durch den Einsatz von Fungiziden bekämpft, die die bekannten Nachteile, wie Grundwassergängigkeit und Akkumulation in der Nahrungskette, besitzen.

- 10 In den letzten Jahren wurden aber auch einige Gene identifiziert, die Resistenz gegen einen bestimmten oder gegen mehrere Erreger vermitteln können. Der Begriff „Vermittlung von Pathogenresistenz“, wie er hier verwendet wird, bedeutet, dass Pflanzen, in denen die Expression der besagten Gene erhöht ist, gegenüber Pflanzen, in denen die Expression der besagten Gene normal ist, weniger empfänglich für die
- 15 Infektion mit bestimmten Pathogenen sind. Zu den Genen, die Pathogenabwehr vermitteln, gehören auch solche Gene, deren Expression durch Infektion mit einem Pathogen angeschaltet wird.

- Zu diesen Genen gehören Peroxidasen und Oxalat-Oxidasen. Die Oxalat-Oxidasen,
- 20 die zu der Familie der germinartigen Proteine gehören, katalysieren die Oxidation von Oxalat, wodurch Wasserstoffperoxid entsteht. Das Wasserstoffperoxid wirkt mikrobizid und kann die Lignifizierung der Zellwände fördern, wodurch das Eindringen von Schädlingen verhindert wird. Außerdem kann es in geringen Konzentrationen hypersensitiven Zelltod hervorrufen. Die Peroxidasen verwenden
- 25 entweder molekularen Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid, um zelluläre Substrate zu oxidieren und dadurch zu entgiften.

- Pathogene, gegenüber denen die Expression der Oxalat-Oxidasen und Peroxidasen in der Epidermis von Pflanzen Resistenz vermitteln kann, schließen zum Beispiel ein:
- 30 Echter Mehltau, *Fusarium* spp., *Rhynchosporium secalis* und *Pyrenophora teres*.

Weitere Gene, die in der Lage sind, Resistenz gegen Pathogene zu vermitteln, sind Chitinasen, Ag-AFP, GSTA1 und WIR1a.

5 Durch die Expression der für diese Enzyme kodierenden Nukleinsäuresequenz in der Epidermis von transgenen Pflanzen mit Hilfe der erfindungsgemäßen Promotorregion können Pflanzen mit erhöhter Pathogenresistenz erhalten werden.

Im Gegensatz zu den Pathogenresistenz vermittelnden Genen gibt es auch pflanzeneigene Gene, die das Eindringen eines Pathogens fördern. Zu diesen gehört
10 das Mlo-Gen, das für einen Sieben-Transmembran-Rezeptor kodiert, der das Eindringen des Mehltau-Pilzes in die Epidermis zu fördern scheint. In diesem Fall ist es sinnvoll, mit der Expression des Mlo-Gens zu interferieren, um das Eindringen von Pilzen in die Pflanze zu verhindern. Dies kann z. B. mit Hilfe der oben beschriebenen RNAi-Methode erfolgen. Dass die Interferenz mit der Expression des
15 Mlo-Gens geeignet ist, das Eindringen des Mehltaupilzes in die Pflanze zu verhindern, wurde in vitro an Blattsegmenten aus Gerste gezeigt, die mit Wolfram-Teilchen beschossen wurden, die mit Mlo-dsRNA beschichtet worden waren (Schweizer et al. (2000), Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals, The Plant Journal, 24 (6), S. 895-903). Jedoch konnte
20 bisher nicht gezeigt werden, dass die epidermis-spezifische Interferenz mit der Mlo-Expression in transgenen Pflanzen den gleichen Effekt hat.

Weitere pflanzliche Gene, die die Interaktion eines Pathogens mit der Pflanze vermitteln und dadurch das Eindringen des Pathogens in die Pflanze fördern können,
25 sind beispielsweise Aminosäuren- oder Zuckertransporter oder Invertasen. Diese Gene eignen sich ebenfalls als Angriffspunkte für das Gen-Silencing. Somit betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung pathogen-resistenter Pflanzen, umfassend die Schritte:

- 5
- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls, in dem der erfindungsgemäße Promotor in operativer Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz, die Pathogenresistenz vermittelt, vorliegt,
 - b) Übertragung des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
 - c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

10 Bevorzugt handelt es sich bei der Pathogenresistenz vermittelnden Nukleinsäuresequenz um die kodierende Region eines Peroxidase- oder Oxalat-Oxidase-Gens oder um eine Sequenz, die mit der endogenen Mlo-RNA interferiert.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung und sollten nicht einschränkend verstanden werden.

15

Abbildungen:

- 1) Nukleinsäuresequenz des GSTA1-Promotors (SEQ ID Nr. 1)
- 20 2) Nukleinsäuresequenz des WIR1a-Introns (SEQ ID Nr. 2)
- 3) Nukleinsäuresequenz der bevorzugten Promotorregion (SEQ ID Nr. 3)
- 4) Nukleinsäuresequenz der TAPERO (Peroxidase) cDNA (SEQ ID Nr. 4)
- 25 5) TAPERO-Expressionsvektor pPS41
- a) Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 5)
- b) Vektorkarte

- 21 -

- 6) Nukleinsäuresequenz der Germin 9f-2.8 (Oxalat-Oxidase) cDNA (SEQ ID Nr. 6)
- 7) Germin-Expressionsvektor pPS24
- 5 a) Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 7)
- b) Vektorkarte
- 8) Sequenz des Mlo-RNAi-Konstrukts (SEQ ID Nr. 8)
- 10 9) Mlo-RNAi-Expressionsvektor pWIR5-TaMlo-RNAi
- a) Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 9)
- b) Vektorkarte
- 10) *In situ* Oxalatoxidase-Aktivität in pPS24-transgenen Pflanzen
- 15 Blätter von Bobwhite Wildtyppflanzen (BW) und von transgenen Linien Nr. 157 und Nr. 170 wurden quergeschnitten und die Oxalatoxidase-Aktivität *in situ* nachgewiesen. Linke Spalte = Reaktion mit Oxalat-Substrat; rechte Spalte = Kontrollreaktion ohne Oxalat-Substrat. Die starke Violettfärbung zeigt Oxalatoxidase-Aktivität in der Epidermis der transgenen Linien an.
- 20 11) Nachweis des TAPERO-Transgens in pPS41-transgenen Pflanzen
- a) im Northern Blot
- Nachweis der Akkumulation von TAPERO RNA mittels Hybridisierung einer WIR3 Probe an Northern blots aus transgenen Weizenlinien der T2 Generation, die das
- 25 pPS41 Konstrukt tragen. Es wurden je 2 Sublinien von 4 ausgewählten Linien plus Wildtyp (BW) im Adultpflanzenstadium analysiert. Blatt 1 = Fahnenblatt. Blätter 2-4 = zunehmend älter. Die TaGer-4 Sonde hybridisiert an eine Gruppe von stressinduzierten Weizengenen und wurde verwendet, um pleiotrope Nebeneffekte der TAPERO-Überexpression zu testen. Keine signifikante Nebenwirkung wurde
- 30 gefunden. EtBr = Beladungskontrolle der Gele, gefärbt mit Ethidiumbromid.

b) im Western Blot

Nachweis der Akkumulation des TAPERO-Proteins mittels Antikörperreaktion auf Western Blots von transgenen Weizenlinien der T2 Generation, die das pPS41

- 5 Konstrukt tragen. Das TAPERO-Transgenprodukt hat die erwartete Grösse von 31 kD. In Bobwhite, Blatt 3 ist eine erhöhte Basalaktivität des TAPERO Gens zu beobachten. Blatt 1 = Fahnenblatt. Coomassie stain = Ladungskontrolle der Gele, gefärbt mit Coomassie Blau R250.

10 12) Nachweis der epidermisspezifischen Transgenexpression

A) durch Northern Blot-Analyse

- Nachweis der Anhäufung von Oxalatoxidase- (links) und TaPERO (rechts)-mRNA in der Blattepidermis von transgenen Pflanzen, die das pPS24- bzw. das pPS41-Konstrukt tragen, mit spezifischen Sonden. W = RNA aus ganzem Blatt; E = RNA
15 aus Blattepidermis. EtBr = Ethidiumbromid gefärbtes Gel als Ladungskontrolle; 26S RNA = Nachhybridisierung des Blots mit einer Sonde gegen die 26S ribosomale RNA als Ladungskontrolle.

B) durch Real-time reverse PCR-Analyse

- 20 Es wurde die Konzentration der TaPERO mRNA in Gesamtblatt und Epidermis der transgenen Linie Nr. 2013 (transformiert mit dem Konstrukt pPS41) bestimmt. Die Daten wurden anhand der konstitutiv exprimierten Kontrollgene UBC (Ubiquitin konjugierendes Enzym) und GAPDH (Glyceraldehyd-Phosphat Dehydrogenase) normalisiert. Die im Gesamtblatt verbleibende Expression stammt aus der nicht-
25 abgezogenen oberen Blattepidermis und aus dem Phloem (Nebenaktivität des Promotors).

C) durch Real-time reverse PCR-Analyse

- Es wurden Wildtyp-Pflanzen (Bobwhite) und die transgenen Linien Nr. 2013 und Nr.
30 2151 (transformiert mit dem pPS 41-Konstrukt) im Adultpflanzenstadium analysiert.

Der Promotor wird vor allem in Blättern und Ähren stark exprimiert. In Stengel und Wurzeln wird das Transgen nicht oder nur schwach exprimiert.

13) Untersuchung der Mehltau-Resistenz von pPS41-transgenen Pflanzen

- 5 Das Fahnenblatt adulter Pflanzen wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inokuliert, zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inokulation wurde der Mehлтаubefall bonitiert. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Inokulationsexperimenten mit Pflanzen der T2 und T3 Generation. Sublinie 2088/2 exprimiert kein TAPERO und ist nicht erhöht resistent. Mittelwert
- 10 "non-silenced" = Mittelwert aus allen Linien außer 2088/2 und allen Experimenten.

14) Sprosswachstum von pPS41-transgenen Pflanzen

Pflanzen der T2 Generation wurden zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen ausgesät und im Adultpflanzenstadium fotografiert.

15

15) Untersuchung der Mehltau-Resistenz von pWIR5-TaMlo-RNAi-transgenen Pflanzen

- Das Fahnenblatt adulter Pflanzen der T2 Generation wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inokuliert, zusammen mit Bobwhite
- 20 Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inokulation wurde der Mehлтаubefall bonitiert. Je 2 Sublinien pro Linie wurden getestet.

Beispiele:

25

In den nachfolgenden Beispielen wurden molekularbiologische Standardmethoden wie *E.coli* Transformation, Restriktionsverdau, Ligation, DNA Extraktion, PCR etc., wie sie im Stand der Technik bekannt sind, gemäss Sambrook et al. (2001), vide supra, durchgeführt. Für alle PCR-Reaktionen wurde „proofreading“ *Pwo*

30 Polymerase (Roche) verwendet.

- 24 -

1) Herstellung des Promotorkonstruktes aus GSTA1-Promotor und WIR1a-Intron
(pPS18)

Die Herstellung erfolgte mehrstufig über folgende Vorläuferkonstrukte: pPS1, pPS3,
5 pPS15. Alle Konstrukte enthielten das GUS Reportergen, um sie direkt im
transienten Assay testen zu können.

pPS1:

Ein 1.9 kb Promotorfragment des WIR1a Gens wurde mit *Pst*I aus einem
10 rekombinanten pBluescript Klon herausgeschnitten und in die *Pst*I-Schnittstelle einer
Expressionskassette vor das GUS-Gen kloniert. Die Expressionskassette basierte auf
pBluescript und enthielt das GUS-Gen gefolgt vom Transkriptionsterminator des
Weizen GSTA1-Gens. Da das GUS-Gen und der GSTA1-Transkriptionsterminator
15 in den verwendeten finalen Konstrukten (siehe Beispiel 2) nicht mehr enthalten sind,
wird auf eine detaillierte Beschreibung dieser Expressionskassette verzichtet. Das
resultierende Konstrukt enthielt eine translationelle WIR1a::GUS Fusion.

pPS3:

Mit den Adaptor-Primern 5' ATA TAT CTG CAG GGA GCC ACG GCC GTC
20 CAC und 5' TAT CCC GGG CCC GTG CCT GGA CGG GAA wurde ein PCR
Fragment von ca. 240 bp erzeugt und dessen Enden mit *Sma*I und *Pst*I geschnitten
(auf Adaptor). Als PCR „template“ diente der genomische WIR1a Klon. Das PCR
Fragment enthielt die letzten 15 Aminosäuren des ersten Exons von WIR1a und das
Intron inklusive „splice site“ Akzeptor und wurde in pPS1, geschnitten mit *Pst*I
25 (partiell) und *Sma*I und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, ligiert. Das
resultierende Konstrukt enthielt eine translationelle WIR1a::GUS Fusion mit dem
WIR1 Intron vor dem GUS Gen. Zudem wurde eine Deletion von Aminosäuren Nr.
18-35 des ersten Exons von WIR1a eingeführt, um die Sekretion des WIR1a::GUS
Fusionsproteins (durch Entfernen des Signalpeptids) zu verhindern.

pPS15:

Der WIR1a Promotor wurde durch ein PCR-Fragment des GSTA1-Promotors ersetzt. Zu diesem Zweck wurde pPS3 mit *Xho*I und *Sna*BI (partiell) verdaut und die Vektorbande über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Das GSTA1-

- 5 Promotorfragment von ca. 2.3 kb Länge wurde mit den Adaptor-Primern 5'ATA TAT CTC GAG TCT AGA ACT AGT GGA TCC und 5'ATA TAT TAC GTA GTT TGT CCG TGA ACT TCA aus dem genomischen GSTA1 Klon mittels PCR
- amplifiziert und an den Enden mit *Xho*I und *Sna*BI geschnitten. Das PCR Fragment wurde mit der geleluerten pPS3 Bande ligiert, resultierend in einer translationellen
- 10 Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit GUS, unter der Kontrolle des GSTA1 Promotors.

pPS18:

pPS15 wurde mit *Pst*I und *Sna*BI (partiell) verdaut, die Vektorbande über Agarose-

- 15 Gelelektrophorese gereinigt und mit einem doppelsträngigen Oligonukleotid (5'GTA CAC AGG CAG CTA GCT CTC GAA ACC TCG CTC GAA ACG CA plus 5'CAT GTG TCC GTC GAT CGA GAG CTT TGG AGC GAG CTT TGC GT) ligiert. Dies ersetzte den Teil des WIR1a Gens um den Translationsstart (46 bp upstream bis 53 bp downstream des Translationsstarts) mit 42 bp der 5'UTR des
- 20 WIR1a-Gens ohne das Translationsinitiationskodon ATG. Das resultierende Konstrukt enthielt eine transkriptionelle Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit GUS, unter der Kontrolle des GSTA1 Promotors.

2) Herstellung der verwendeten Konstrukte

- 25 a) Expressionsvektor pPS24 (Oxalat-Oxidase-Expression unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors)

Ein *Hind*III/*Sph*I Fragment von 745 bp Länge des Weizen gf-2.8 Gens (Oxalat-Oxidase; Acc. Nr. M63223) enthaltend den gesamten offenen Leserahmen (ORF) wurde in die pflanzliche Expressionskassette pGY1 subkloniert, was im Konstrukt

30 pGermin (beschrieben in Schweizer et al., 1999) resultierte. Für diese Klonierung

wurde das Oxalat-Oxidase-Fragment in einen Zwischenvektor ligiert, um das Fragment mittels der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Pst*II in pGY1 ligieren zu können. Aus pGermin wurde ein *Sma*I/*Eco*RI Fragment von ca. 1 kb Länge, enthaltend das Oxalat-Oxidase-Gen und den CamV 35S Terminator, in den

5 *Sma*I/*Eco*RI-geschnittenen und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigten pPS18 Vektor ligiert. Das resultierende Konstrukt enthielt eine transkriptionelle Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit dem Oxalat-Oxidase-Gen unter der Kontrolle des GstA1-Promotors. Gegenüber pPS18 enthielt das Konstrukt nicht mehr den GstA1 Transkriptionsterminator, sondern denjenigen des CamV 35S Gens.

10

b) Expressionsvektor pPS41 (TAPERO-Expression unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors)

Aus pWIR3 (enthaltend eine transkriptionelle Fusion zwischen dem CamV 35S Promotor und TAPERO; Schweizer et al., 1999) wurde ein TAPERO-Fragment von

15 ca. 1.2 kb Länge durch Restriktionsverdau mit *Sma*I und *Pst*II isoliert. Das TAPERO-Fragment wurde in Vektor pPS24, der mit *Sma*I und *Pst*II (partiell) verdaut und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt wurde, ligiert. Dies resultierte in einer transkriptionellen Fusion des intronenthaltenden WIR1a-Genfragmentes mit dem TAPERO-Gen (Acc. Nr. X56011), unter der Kontrolle des GstA1-Promotors, in dem

20 das Oxalat-Oxidase Gen durch das TAPERO-Gen ausgetauscht wurde. Wie pPS24 enthält pPS41 den Transkriptionsterminator des CamV 35S Gens.

c) Expressionsvektor pWIR5-TaMlo-RNAi (Expression des Mlo-RNAi-Konstrukts unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors)

25 Zunächst wurde das im Vektor pGEM-Teasy subklonierte 3. Intron des *Mla*I Resistenzgens aus Gerste (ca. 1.1 kb) mittels *Eco*RI und *Pst*II isoliert und in den ebenfalls *Eco*RI und *Pst*II geschnittenen Vektor pBSw41 (pBluescript-Derivat mit partieller *TaMlo*I cDNA, kloniert von Candace Elliott im Rahmen ihrer Dissertation; GenBank accession no. AF361933) ligiert. Aus diesem Konstrukt wurde das *Mla*I

30 Intron zusammen mit einem Teil der codierenden Sequenz des *TaMlo*I-Gens als ca.

- 27 -

1.55 kb *PstI/MscI*-Fragment isoliert (= Fragment 1). Parallel hierzu wurde per PCR aus dem Plasmid pBSw41 mit den Oligonukleotiden T3 (Standard-Sequenzier-Primer für pBluescript) und TaMlo1-1 (5' GTC GCA TGC CTG TCC ACA CGA AAT GTG C 3', *SphI* Restriktionsschnittstelle unterstrichen) ein ca. 450 bp großes
5 Fragment amplifiziert. Nachfolgend wurde das PCR-Fragment mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *SphI* verdaut (= Fragment 2). Der Vektor pPS24 (Promotor + Oxalat-Oxidase, siehe oben) wurde mittels Restriktionsverdau mit *SmaI* und *SphI* geöffnet und das herausgeschnittene Oxalat-Oxidase-Genfragment
verworfen. In einer Drei-Komponenten-Ligation wurden sodann die oben
10 beschriebenen Fragmente 1 und 2 in den *SmaI/SphI* geschnittenen Vektor pPS24 ligiert. Bei dieser Ligation sind die Enden der *MscI* und *SmaI* geschnittenen Komponenten kompatibel, da es sich bei beiden um sogenannte „stumpfe Enden“ (blunt ends) handelt. Das resultierende Konstrukt (pTaMlo1 RNAi) enthält ca. 300 bp des *TaMlo1*-Gens sowie ca. 150 bp Polylinker/Adaptor-Sequenz als „inverted
15 repeats“, separiert durch das *MlaI*-Intron. Die Kontrolle dieser Transkriptionseinheit unterliegt dem GstA1 Promotor.

Anmerkung: Das hier aus historischen Gründen als *TaMlo1* bezeichnete Gen erhielt später die Bezeichnung *TaMloA1* (Elliott *et al.*, 2002). Mol. Plant Microbe Interact. 15: 1069-1077 (2002).

20

3) Transformation der Weizenpflanzen

Weizenpflanzen (cv. Bobwhite) wurden in Phytokammern für 40 Tage bei 15°C tagsüber und 12°C nachts unter Kurztagbedingungen (10h/d, ca. 600 µE) und
nachfolgend im Gewächshaus bei 18/16°C und einer Photoperiode von mindestens
25 16 h angezogen. Die Ähren wurden entweder unmittelbar verwendet oder bis zu 5 Tage bei 4°C aufbewahrt. Die von der Ähre abgenommenen Karyopsen wurden für 2 Minuten mit 70% Ethanol und dann für 15 bis 20 Minuten in 5% Natriumhypochlorit-Lösung/ 0,1% Tween 20 oberflächensterilisiert und schließlich
viermal mit sterilem Aqua bidest gewaschen.

30

- 28 -

Unreife Embryonen mit einer Größe von 0,5 bis 1,5 mm wurden unter sterilen Bedingungen aus den Karyopsen herauspräpariert und mit dem Scutellum nach oben auf Kallusinduktions-Medium in Petrischalen aufgelegt (Basismedium nach Murashige Skoog (1962) mit 2 mg/l 2,4-D, 40 g Maltose-Monohydrat, 500 mg/l L-Glutamin, 100 mg/l Caseinhydrolysat, 5 µM CuSO₄ und 0,25% Phytigel). Die Kulturen wurden bei 25°C im Dunkeln inkubiert.

Fünf bis sieben Tage nach Isolierung der Embryonen erfolgte die biolistische Transformation. Vier bis sechs Stunden vor dem Partikelbeschuss wurden die bereits proliferierenden Embryonen auf neues Medium mit verringertem Wasserpotenzial übertragen (wie oben, supplementiert mit 0,3 M Mannitol) und bei 25°C im Dunkeln inkubiert.

Das Plasmid pAHC20 (Christensen and Quail 1996), das das Phosphinothricinacetyltransferase-codierende *bar*-Gen enthält, wurde in einem molaren Verhältnis von 1:1 mit einem zu co-transformierenden Vektor gemischt. Insgesamt wurden dann 10 µl Plasmid-DNA-Lösung auf die Partikel von 25 µl einer 60 mg/l Goldsuspension präzipitiert. Für einen Beschuss wurden 30 µg Partikel in 5 µl Ethanol auf einen Makrocarrier aufgetragen. Der Beschuss erfolgte entsprechend den Herstellerangaben der DuPont PDS-1000/He.

Zwölf bis 16 Stunden nach dem Partikelbeschuss wurden die Explantate auf neues Kallusinduktions-Medium (wie für die Vorkultur der Embryonen) übertragen und 10 Tage bei 25°C im dunkeln inkubiert.

Die Kalli wurden danach auf Differenzierungsmedium übertragen (Basismedium nach Murashige and Skoog (1962) mit 20 g/l Saccharose, 5 µM CuSO₄, 0,25% Phytigel und 3 mg/l Bialaphos) und bei einer Photoperiode von 16h bei 200 µE und 25°C inkubiert.

30

- 29 -

Nach 2 Wochen erfolgte die Übertragung der nicht verbräunten Kalli auf Regenerationsmedium (Basismedium nach Murashige and Skoog (1962) mit 20 g/l Saccharose, 0,25% Phytigel und 4 mg/l Bialaphos) und eine weitere Inkubation bei einer Photoperiode von 16h bei 200 μ E und 25°C.

5

Nach weiteren 2 Wochen wurden die entstandenen Sprosse vereinzelt, in Kulturröhrchen mit Regenerationsmedium übertragen und bei einer Photoperiode von 16h bei 200 μ E und 25°C weiterkultiviert.

- 10 Die Identifizierung transgener Regenerate erfolgte per PAT-Aktivitätstest von Blattextrakten nach Spencer et al. (1990) bzw. durch Amplifizierung Transgen-spezifischer Sequenzen aus genomischer DNA der Kandidatenpflänzchen und/oder Southern Blot unter Verwendung einer entsprechenden Sonde.
- 15 Die Transformationseffizienz der Methode lag in Abhängigkeit von der Qualität des Ausgangsmaterials zwischen 0,5 bis 3 transgenen Pflanzen pro 100 kultivierten Embryonen.

4) *In situ* Oxalat-Oxidase-Aktivität in Pflanzen mit dem pPS24-Konstrukt

- 20 Blattsegmente von Bobwhite Wildtyppflanzen oder von pPS24-transgenen Weizenpflanzen der T3 Generation wurden unter Vakuum mit Oxalat-Oxidase-Nachweislösung (2.5 mM Oxalsäure, 3.5 mM freies EDTA, 0.6 mg/ml 4-Chlor-1-Naphthol, 50 μ g/ml Peroxidase aus Meeretich, 20% v/v Ethanol, mit Tris Base auf pH 4.0 eingestellt) infiltriert und über Nacht bei +37°C inkubiert. Nach Entfernen
- 25 der Nachweislösung wurden die Blätter für weitere 24 h bei +4°C in H₂O inkubiert. Danach wurden die Blätter von Hand mittels Skalpell in dünne Segmente quergeschnitten und mikroskopiert. Die Phasenkontrast-Lichtmikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Axiophot bei 100-facher Vergrößerung. Zellen mit Oxalat Oxidase Expression besitzen violett gefärbte Zellwände.

30

- 30 -

5) Nachweis des TAPERO-Transgens in pPS41-transgenen Pflanzen durch Northern-Blot-Analyse

Blätter von Bobwhite und von pPS41-transgenen Pflanzen der T2 Generation (je ca. 1 g Frischgewicht, FG), beide im Fahnenblattstadium, wurden in flüssigen Stickstoff

5 homogenisiert, bis feines Pulver entstand. Das Pulver wurde zu 3 ml RNA-Extraktionspuffer (0.5 M Tris-Cl pH 8.0; 0.25 M Na-EDTA; 5% (w/v) SDS) und 1,5 ml puffergesättigtem Phenol gegeben (15 ml Plastik-Röhrchen) und gut geschüttelt. Die Extrakte wurden für 30 min bei 4000 rpm-5000 rpm, 20°C zentifugiert (swing out, Heraeus Varifuge). Es wurde 1,5 ml Chloroform zugegeben (ohne Überstand

10 abzugießen) und das Röhrchen mehrere Male invertiert. Die Extrakte wurden für 30 min bei 4000 rpm-5000 rpm, 20°C rezentifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Röhrchen (15 ml Plastik-Röhrchen) gegossen. Die RNA wurde durch Zugabe von 3 ml 6 M LiCl gefällt (über Nacht, 4°C). Die gefällte RNA wurde für 30 min bei 12500 rpm, 4°C zentifugiert (Festrotor, Hermle Z360K), die RNA-Pellets wurden in

15 500-1000 µl 70% Ethanol aufgenommen (RNA löst sich nicht) und in Eppendorf röhrchen überführt. Die Proben wurden für 10 min bei 14000 rpm, 4°C zentrifugiert (Festrotor, Eppendorf Centrifuge 5417R) und der Überstand abgehoben. Die RNA-Pellets wurden 5 min bei 37°C getrocknet, in 100 µl-200 µl TE aufgenommen und 5-10 min bei 75°C gelöst. Die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese der RNA in

20 formaldehydhaltigen Gelen und der Transfer auf Nylonmembranen (Hybond N, Amersham) erfolgte gemäss Standardprotokollen (Sambrook et al., vide supra). Pro Probe wurden 10 µg RNA aufgetragen.

Die radioaktive Sondenmarkierung mit α ³²P-dCTP erfolgte nach der Methode des „random prime labelling“ unter Verwendung eines Kits (Roche). Die Hybridisierung

25 erfolgte über Nacht bei 65°C in CHURCH Puffer (0,5 M NaPhosphat pH 7,2; 1 % (w/v) BSA; 7 % (w/v) SDS; 1 mM Na₂EDTA). Die Blots wurden 2 x 15 min in Waschlösung (0.1 x SSC; 0.1 % w/v SDS) bei 65°C gewaschen und anschließend für 16-48 h gegen Phosphorimager-Screens exponiert. Die exponierten Screens wurden mit einem Phosphorimagergerät (FujiFilm FLA 3000) eingescannt und als

30 Bilddateien im TIFF Format exportiert.

6) Nachweis des TAPERO-Transgens in pPS41-transgenen Pflanzen durch Western-Blot-Analyse

- Blattspitzen von Bobwhite und von pPS41-transgenen Pflanzen der T2 Generation, beide im Fahnenblattstadium, wurden in IWF Puffer (32 mM Na-Phosphat; 84 mM Citrat; pH 2.8; Spatelspitze Polyvinylpolypyrrolidon) homogenisiert. Die Homogenate wurden für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 0.5 g/ml Ammoniumacetat versetzt und säurelösliche Proteine über Nacht bei 4°C gefällt. Die Proteine wurden für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Proteinpellets wurden in 50 µl/g FG Resuspensionspuffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5; 20 % (v/v) Glycerin) aufgenommen. Zu 20 µl Probe wurden 5 µl 4-fach konzentrierter SDS Probenpuffer zugegeben, und die Proben wurden mit soviel (1-5 µl) gesättigter Tris-Lösung versetzt, bis der Farbumschlag des Bromphenolblaus zu Blau stattfand. Pro Spur wurden 12,5 µl gekochte Probe in denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (15%iges Trenngel) nach einer Standardmethode unter Verwendung von Minigelapparaturen der Firma Bio-Rad aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder Coomassie gefärbt (als Beladungskontrolle) oder nach einer Standardmethode auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (geblottet). Die Membranen wurden nach einer Standardmethode mit einem ersten, polyklonalen Antikörper (Verdünnung 1:2000), gerichtet gegen das Prx8 Protein aus Gerste (ein homologes Protein zu TAPERO), inkubiert, gefolgt vom zweiten Antikörper (Verdünnung 1:2000), der gegen Kaninchen-Antikörper gerichtet und an den alkalische Phosphatase gekoppelt war. Die TAPERO Proteinbanden wurden durch lokalisierte alkalische Phosphataseaktivität (BCIP/NBT Färbelösungen; Fertigtabletten (Roche)) nachgewiesen.

- 7) Nachweis der epidermisspezifischen Transgenexpression durch Northern-Blot-Analyse und Real-Time-PCR-Analyse

Die RNA-Extraktion und die Northern-Blot-Analyse wurden durchgeführt wie in Beispiel 5 beschrieben. Die Real-Time-PCR-Analyse erfolgte mit einem LightCycler®-Gerät (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben.

5

8) Mehltäuresistenz in pPS41- bzw. pWIR5-TaMlo-RNAi-transgenen Pflanzen

Für den Resistenztest wurden adulte, im Gewächshaus angezogene pPS41- oder pWIR5-TaMlo-RNAi-transgene Weizenpflanzen mit voll entwickeltem, frisch geschobenem Fahnenblatt verwendet. Als Kontrollen dienten gleichzeitig

10

angezogene Wildtyp-Pflanzen

cv. Bobwhite. Die apikale Hälfte des Fahnenblattes wurde abgeschnitten und auf 0,5% (w/v) Phytoagar, der mit 20 ppm Benzimidazol versetzt war, in 20 x 20 cm großen Polycarbonat-Schalen aufgelegt. Pro Schale wurde eine transgene Sublinie (je 20 Blätter) plus Bobwhite Wildtyp (je 6 Blätter) aufgelegt. Die Blattsegmente

15 wurden in einem Inokulationsturm mit Mehltausporen inokuliert, indem Sporen von 4 stark inokulierten Weizenblättern in den Turm eingeblasen wurden. Nach 5 min wurden die Schalen entfernt, geschlossen und bei 20°C und indirektem Tageslicht inkubiert. Sieben Tage nach Inokulation wurde der Mehltaubefall bonitiert unter Verwendung eines Klassenbonitursystems (Schweizer et al., 1995). Die Resistenz

20 wurde bezogen auf die sich auf der jeweiligen Phytoagarplatte befindlichen Kontrollblätter berechnet.

Literatur:

- Christensen and Quail (1996) Transgenic Res. 5: 213-218.
- 5 Elliott *et al.*, (2002). Molecular Plant Microbe Interactions 15: 1069-1077.
- Murashige and Skoog (1962) Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- 10 Schweizer, P., Vallélian-Bindschedler, L., and Mössinger, E. (1995). Heat-induced resistance in barley to the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, Physiological and Molecular Plant Pathology 47, 51-66.
- 15 Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O., and Dudler, R. (1999). A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat, Mol Plant-Microbe Interact 12, 647-654.
- Spencer et al. (1990) TAG 79: 625-631.

- 34 -

ANSPRÜCHE

1. Promotorregion mit Spezifität für die pflanzliche Epidermis,
5 umfassend eine erste, aus dem Promotor des Gens GSTA1 stammende Sequenz, und
eine zweite, aus dem Intron des Gens WIR1a stammende Sequenz.
2. Promotorregion nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ersten Sequenz um SEQ ID Nr. 1 und
10 bei der zweiten Sequenz um SEQ ID Nr. 2 handelt.
3. Promotorregion nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass sie ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
- 15 a) Promotorregionen, die die unter SEQ ID Nr. 3 angegebene
Nukleinsäuresequenz umfassen,
b) Promotorregionen, die einen funktionalen Teil der unter SEQ ID Nr. 3
angegebenen Nukleinsäuresequenz umfassen, und
c) Promotorregionen, die eine Sequenz aufweisen, die unter stringenten
20 Bedingungen mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen
Nukleinsäuresequenz hybridisiert.
4. Chimäres Gen,
dadurch gekennzeichnet, dass es eine Promotorregion nach einem der Ansprüche 1
bis 3 in operativer Verknüpfung mit einer kodierenden Sequenz enthält.
25
5. Chimäres Gen nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet, dass seine Expression zu einem erhöhten Gehalt des von
der kodierenden Sequenz kodierten Proteins in der Epidermis führt.

- 35 -

6. Chimäres Gen nach Anspruch 4 oder 5,
dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Sequenz aus einem Resistenzgen
stammt.
- 5 7. Chimäres Gen oder rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach
Anspruch 5 oder 6,
dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Sequenz für eine Peroxidase oder
eine Oxalat-Oxidase-kodiert.
- 10 8. Chimäres Gen nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet, dass seine Expression die Expression des entsprechenden
endogenen Gens in der Epidermis unterdrückt.
9. Chimäres Gen nach Anspruch 8,
15 **dadurch gekennzeichnet**, dass die kodierende Sequenz in antisense-Orientierung
vorliegt.
10. Chimäres Gen nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet, dass die Unterdrückung der Expression des endogenen
20 Gens durch RNA-Interferenz erfolgt.
11. Chimäres Gen nach einem der Ansprüche 8 bis 10,
dadurch gekennzeichnet, dass das endogene Gen, dessen Expression unterdrückt
wird, das Mlo-Gen ist.
- 25 12. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend eine
Promotorregion nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder ein chimäres Gen nach
einem der Ansprüche 4 bis 11.

- 36 -

13. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 12, zusätzlich umfassend transkriptionelle Terminationssequenzen.

14. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit
5 epidermisspezifischer Expression eines Transgens, umfassend die Schritte:
a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 12 oder 13,
b) Übertragung des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) auf
pflanzliche Zellen und
10 c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen

15. Transgene Pflanzen, enthaltend ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 12 oder 13 oder hergestellt nach einem
15 Verfahren nach Anspruch 14, sowie transgene Teile dieser Pflanzen und deren transgenes Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze.

16. Transgene Pflanzen nach Anspruch 15, bei denen es sich um
20 monokotyledone Pflanzen handelt.

17. Transgene Pflanzen nach Anspruch 16, bei denen es sich um Poaceen handelt.

25 18. Transgene Pflanzen nach Anspruch 17, bei denen es sich um Weizen oder Gerste handelt.

19. Verwendung einer Promotorregion nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur epidermisspezifischen Expression von Transgenen in Pflanzen.

30

-37-

20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei das Transgen ein Resistenzgen ist.

21. Verfahren zur Erhöhung der Pathogenresistenz in transgenen Pflanzen, umfassend die Schritte:

- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 12 oder 13,
- b) Übertragung des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
- c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

22. Transgene Pflanzen mit erhöhter Pathogenresistenz, enthaltend ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 12 bis 13 oder hergestellt nach einem Verfahren nach Anspruch 21, sowie transgene Teile dieser Pflanzen und deren transgenes Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze.

23. Transgene Pflanzen nach Anspruch 22, bei denen es sich um monokotyledone Pflanzen handelt.

24. Transgene Pflanzen nach Anspruch 23, bei denen es sich um Poaceen handelt.

25. Transgene Pflanzen nach Anspruch 24, bei denen es sich um Weizen oder Gerste handelt.

- 38 -

26. Transgene Pflanzen nach einem der Ansprüche 22 bis 25,
dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Resistenz gegen Echten Mehltau
zeigen.

Abbildung 1:

GstA1 Promotor

GACGCCGAAGTGAGCCGACAGCCCCAGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGAC
TGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGCGGGTGTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCC
TCACCGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTGGGGTCTGCCGGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGTCTGCCGGCTGGCGTTCT
GCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGCGTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTG
GCCAAGAGATCCGAGTCCCTGGGGAGATCAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGG
GCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGGCTGCTAGCTAGGGAAGTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGC
TAAGTACTTTAACTTTCTTCTTCCACATCCACCTGATTGAGATTATTTTGATCTAAATTAAGTTGCAAAAAATATATGTG
TGATATCCATCTACTATAATTGCTTACAATCAAAATTATATGTGATTTTTTTAGTTTAGAAGATTTATATGCACAGTAA
ATCTGAATGTTCTTACATGCATGATTTAGTTAACTTTAAAGAGTTATACTAACTAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGG
AGCAACACCAAACTCGTGAGGTGTTTTGCCTACGGAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTA
GGATAAACGTAAAACCTTCTCGATGTATCTTTTATAACAACATTGTAGTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTTAACACT
TTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATCCACACTCTAGCCAAACGAACATTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAG
CCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCTATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAGTGATGTG
TCGCCTACCAATGGGCCAACTGCTAGCGATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGC
AAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCAAGCTTAAGTCTCGGAAGTTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAAGATTAATA
AAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAAAATTATTCAATTGAGTGACAACGAAAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGT
TGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTACCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTTTCGAGACA
ACGAGAGGGGCACATTGCTTTTGGTGCTACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCCGCG
TTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTAGCGAAAAATCTCCATGTTGGAATATGTGCGGCAGCCGGATAGCCGCCATGCAT
GTAAAGTCTCTTTTACCTTTACACTTGCTCAAGTGACACTGTATGTCGCCTACCATTGCTAAATCAATGGGCCAACTGC
TAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATTTACAGTGTTTTGCTACAGTTCTCTGACTTTGTTTCTTCAATTTAGACTAGCTG
ACTACTGTGCTTACCTGCCTTCCCTTCTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAG
GGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAATTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCCTTACCGATGTTGGGGGGC
TGTCGGAATTTGGTTCCCGCATCTACAAAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGCACGTGTTT
CTAACTAGTACTTACTTCTTTCGCACCACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTACCC
GGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTAATTTGGCACTCATTTTCATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAG
ATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATGTAGCCTTGTTATTCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGTCCCTGCTCT
GTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAGGCCTCCTCCCA

Abbildung 2:

WIR1A Intron:

GTCAGTCGTCGGACGGTGTCCGTTCAATTCCTCCCCATTTTGTAAATTGATTAACCTTGTTATACATGCTGACCTCGACCTGCT
GAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACC

Abbildung 3:

GstA1 Promotor mit WIRla Exon/Intron:

GACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCCAGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGAC
TGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGCGGGTGTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCC
TCACGGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTGGGGTTCGCCGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGGTGCCGCTGGCGTTCT
GCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGCGTCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTG
GCGAAGAGATCCGAGTCTGGGAGATCAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGG
GCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGGCTGCTAGCTAGGGAACGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGC
TAAGTACTTAACTTTCCCTTCTCACATCCACCTGATTAGATTATTTTGATCTAAATTAAGTTGCAAAAAATATATGTG
TGATATCCATCTACTATAATTGCTTACAATCAAAATATATGTGATTTTTTTTAGTTTAGAAGATTTATATGCACAGTAA
ATCTGAATGTTCTTCATGTCATGATTTAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAACTAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGG
AGCAACACCAAACCTCGTGAGGTGTTTTGCCTACGGAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTA
GGATAAACGTAACCTTCTCGATGTATCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTTAACT
TTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATTCCACACTTAGCCAAACGAAGTATTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAG
CCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCTATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAAGTGATGTG
TCGCCTACCAATGGGCCAACTGCTAGCGATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGC
AAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCAAGCTTAACTCTCGGAAGTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAAGATTAAAA
AAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAAAATTTTCAATTGAGTGACAACGAAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGT
TGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTACCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTTTCGAGACA
ACGAGAGGGCACATTGCTTTTGGTGCTACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCCGCG
TTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTAGCGAAAAATCTTCCATGTGGAATATGTCGGCAGCCGGATAGCCGCCATGCAT
GTAAAGTCTCTTTTACCTTTACACTTGCTCAAGTGACACTGTATGTGCGCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGC
TAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATTTACAGTGTTTTGCTACAGTTCTCTGACTTTGTTTCTTCATTTTAGACTAGCTG
ACTACTGTGCTTACCTGCCTTCCCTTCTCCAGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAG
GGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAATTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCCCTTACCAGATGTTTGGGGGGC
TGTCGGAATTTGGTCCGCGATCTACAAAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCAATCCGTACCAACGCACGTGTTT
CTAACTAGTACTTACTTCTTTCGCACCACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTACCC
GGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTAATTTGGCACTCATCTTTCATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAG
ATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATGTAGCCTTGTTATTTTCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCT
GTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAGGCCCTCTCCACACACACAGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCTCCAGTAT
CTGCCCTCTCTGCTGCTGCTGCTAGAGCATCCATCACGTGAAGTTCACGGACAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTCG
AAACCTCGCTCGAAACGCACCTGCAGATCGCTCTCTTCGTGCTGCTCGCCGCGATCATCATCAACAGCTCCGTCTGCCTT
GGAGCCACGGCCGTCCACGACGCCGCCGCTCAGGTGAGTCGTGCGGACGGTGTCCGTTTCAATTTCTCCCATTTTTGTAA
TTGATTAAGTTGTTATACATGCTGACCTCGACCTGCTGAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACC

Abbildung 4:

TAPERO cDNA:

ACCACCACACCACTCCACCAGTAAGAAGTGCAGCAGGTAGCTAGTAAGCCGGCGTAGCTTTGCTCTTGACGCTAGCTAGC
TAACCATGGCCGCCTCTGCCTCTTGCCCTTTCTCTTGTGGTGCTCGTGGCTCTGGCCACGGCGGGCGTCGGCGCAGCTGTCA
CCGACCTTCTACGACACGTCTCTGCCCCAGGGCCCTGGCCATCATCAAGAGTGGCGTCATGGCCGCCGTGAGCAGCGACCC
TCGGATGGGCGCGTCGCTGCTCCGGCTGCACTTCCACGACTGCTTCGTCCAAGGCTGCGACGCGTCTGTTTTGCTGTCTG
GCATGGAACAAAATGCTATCCCGAACGCGGGGTGCTGAGGGGCTTCGGCGTCATCGACAGCATCAAGACGCAGATCGAG
GCCATCTGCAATCAGACCGTCTCCTGCGCCGACATCCTCACCCTGCGCGCCCGTGACTCCGTTGTAGCCCTCGGAGGGCC
GTCATGGACAGTCCCTCTGGGGAGAAGAGATTCCACAGATGCAAACGAGGCGGGCGGCAAACAGCGACCTGCCAGGCTTTA
CATCTAGCCGGTCAGATCTTGAGCTGGCATTACAGAAACAAGGGCTCCTTACGATCGACATGGTGGCCCTCTCGGGCGCG
CACACCATCGGCCAGGCGCAGTGTGGGACCTTTAAGGACAGGATCTACAATGAGACTAACATCGACACGGCCTTCGCCAC
ATCTCTCCGGGCCAACTGCCCCAGGTCAAACGGCGACGGGAGCCTGGCGAACCTGGACACGACGACGGCCAACACGTTG
ATAACGCCTACTACACCAACCTCATGTACAGAAGGGGCTCCTGCACTCGGACCAGGTGCTGTTCAACAACGACACCACC
GACAACACTGTCCGGAACCTTTGCGTCGAACCCAGCGGCGTTCAGCAGCGCCTTCACGACCGCCATGATCAAGATGGGCAA
CATCGCGCCGAAGACAGGCACGCAGGGGCGAGATCAGGCTCAGCTGCTCCAGGGTGAACCTCGTGATTGATAGACGAGTTAC
TGCATACTAGCCAGCAGACACGTACGTGAATGAATAAGGCCACAGAACCAAGTGGCCAATATAAATACCAGCTCTTGAAA
CCGTGTATTTTATGTACGAGTAGCAGCAAATCATGCATGCATCTACACATATATATGTAACGATCGAATCCCACCTTCT
CATGCAAAGGCATGGAGAATTACTATCAATCTTAGTTATACGTGA

Eigenschaften von pPS41:

```

Gesamtlänge: 7011 bp
vector Backbone: pBluescript SK+, ganzes Konstrukt zwischen XhoI und SacI
Schnittstellen.
GstA1 Promoter: 694-2891
Transcription start: 2892
GstA1 5' UTR 2892-2988
WIR1 5' UTR (part) 2989-3034
WIR1 part of 5' CDS + Intron 3035-3246
TAPERO cDNA 3264-4509
ATG TAPERO 3348
Stop codon: 4284
Poly(A) 4510-4514
CamV 35S Terminator: 4576-4776

```

CTAATTTGTAAGCGTTAATATTTTGTGTTAAATTCGCGTTAAATTTTGTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCG
AAATCGGCAAAATCCCTTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCA
CTATTAAGAAGCTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACC
CTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCCGATTAGAGCTTGAC
GGGGAAGGCCGGAACCTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCAGGGCGAGGGCGCTGGCAGTGTAGCG
GTCACGCTGCGCGTAGTAAACCAACCCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTGCCATTACAGGCTGCG
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT
TAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTACAGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTA
TAGGGCGAATTTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGTCTAGAAGTATGAGTATCCCCGACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCC
AGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGACTAGTACGCTGGATCGGCGAGGTGACTGAGTAGCAGAGCACTGGTCTGGC
GGGTGTTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCTCACCGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTG
GGGGTCGCGGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGGTGCGCGGCTGGCGTTCTGCTGCGGGGTGGGAGTGC CGGACCGGC
GTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTGGCGAAGAGGATCCGAGTCTCTGGGGAGAT
CAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGCCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGGGCGTGGCTGATCAACGAGGTGCTAGG
CTGCTAGCTAGGGAATCGGATCTGGAACGTTGGAGGAGCGAAGTCGGTATGCTAAGTACTTTAACTTCTCTTCCACA
TCCACTGATTAGATTATTTTGTATCTAAATTAAGTTGCAAAAAATATATGTGTGATATCCATCTACTATAATTGCTTAC
AATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTTAGTTTAGAAGATTTATATGCACAGTAAATCTGAATGTTCTTACATGCATGATT
TAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAAGTCTTGTGATAAGAGATCTTTTGGAGCAACACCAAAACCTCGTGAGGTGTTT
TGCCCTACGGAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTAGGATAACGTAACCACTTCTCGATGTA
CTCTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGAGAGAGTGATTTTAACTTTGTGTTTAAAGTAGAATAAGTTATT
CCACTCTAGCCAAACGAACATATTGGCAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAGCCAGAGCCGTGGAAGTCTGCTCTTGCT
ATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAGAGTGATGTGTCGCTACCAATGGGCCAACTGCTAGC
GATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGCAAGTGGAAAAATTGATTGCTGCGCA
AGCTTAACTCTCGGAATCTATAGCAATTCAACTGAATCAGAAACAAGATTAAAAAAATCAACTTTCCATCGATAGTGA
AAATTTCAATTGAGTGACAAACGAAATCATATTGGAATGTACATTACTTTGTTGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCT
CCTTTTGTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTTTCGAGACAACGAGAGGGCACATTGCTTTTGGTGCT
ACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCCGCGTTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTA
GCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTCGGCAGCCGGATAGCCGCCATGCATGTAAGTCTCTTTACCTTTACACTTG
CTCAAGTGACATGTATGTCGCTACCACCTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGCTAGGACGTAATAGTAGCAAGTTGATT
TAGAGTGTCTTGTCTACAGTTCTCTGACTTTGTTCTTTCATTTTAGACTAGCTGACTACTGTGCTTACCTGCCTTCCCTT
CTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAGGGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAA
TTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCTTACCAGATGTTTGGGGGGCTGTGCGAATTTGTTCCGCGATCTACA
AAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGACAGCTGTTCTAACTAGTACTTCTCTCGCACC
ACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTCCCGGTTTAAATGATTCAAGAGCTCAATTA
ATTTGGCACTCATATTTCTATATATCTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAGATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATG
TAGCCTTGTTATTTCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCTGTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAG
GCCTCCTCCACACACACAGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCTCCAGTATCTGCCCCCTCTCTGCCCTGCCTAGAGC
ATCCATCAGCTGAAGTTACCGGACAACACTACGTACACAGGCAGTACGCTCGAAGCTCGCTCGAAACGCACTCGAGC
TCGCTCTCTTCGTCGTCGCGCGCATCATCAACAGCTCCGTGCTGCTTGAGGCCACGGCCGCTCACAGACGCCGCG
CCCTCAGTGCAGTCGTCGAGCGGTGTCGGTTCATTTCTCCCCATTTTTGTAATTGATTAACTTGTATACATGCTGACC
TCGACCTGCTGAATAACGTCGGTCCATGGTTTTCCGTCACAGCACCCCGGCTGCAGGAATCACCACCACACCACCTCCA
CCAGTAAGAAGTGCAGCAGGTAGCTAGTAGAAGCCGCGCTAGCTTTGCTCTTGCAGTACGTAACCATGCGCCGCTCT
GCCTCTTGCCCTTTCTCTTGTGGTGCTCGTGCTGCTGCGCACGGCGCGCTGGCGCAGCTGTCAACGCTTCTACGCTGAC
GTCTTGCCCCAGGGCCCTGGCCATCATCAAGAGTGGCGTCAATGGCCGCGTGAGCAGCAGCCCTCGATGGGCGCGTGC
TGCTCCGCTGCACTTCCAGCACTGCTTCTGTCGAAGGCTGCGACGCGTCTGTTTTGCTGTCTGGCATGGAACAAATGCT
ATCCCGAACGCGGGGTGCTGAGGGGCTTCCGCGTCATCGACAGCATCAAGACGCGAGATCGAGGCCATCTGCAATCAGAC
CGTCTCTTGC CGCAGATCTCTCACCGTCGCGCGCCGCTGACTTCGTTGTAGCCCTCGGAGGGCCGTCATGGACAGTCCCTC
TGGGGAGAAGAGATCCACAGATGCAACAGGCGCGGCAACAGCGACCTGCCAGGCTTACATCTAGCCGCTCAGAT
CTTGAGCTGGCATTAGAAACAAGGGCCTCTTACGATCGACATGGTGGCCCTCTCGGGCGCGCACACCATCGGCCAGGC
CGAGTGTGGGACCTTTAAGGACAGGATCTACAATGAGACTAACATCGACACGGCCTTCGCCACATCTCTCCGGGCCAACT

GCCCCAGGTCAAACGGCGACGGGAGCCTGGCGAACCTGGACACGACGACGGCCAAACAGTTCGATAACGCCTACTACACC
AACCTCATGTACAGAAGGGGCTCCTGCACTCGGACCAGGTGCTGTTCAACAACGACACCACCGACAACACTGTCCGGAA
CTTTGCGTCGAACCCAGCGGCTTCAGCAGCGCCTTCACGACCGCCATGATCAAGATGGGCAACATCGCGCCGAAGACAG
GCACGCAGGGGCAGATCAGGCTCAGCTGCTCCAGGGTGAACCTCGTGATTGATAGACGAGTTACTGCATACTAGCCAGCAC
GACACGTACGTGAATGAATAAGGCCACAGAACCAGTGGCCAAATATAAATACCAGCTCTTGAAACCGTGATTTTATGTAC
GAGTAGCAGCAAATCATGCATGCATCTACACATATATATGTAACGATCGAATTTCCCACTTTCTCATGCAAAGGCATGGAG
AATTACTATCAATCTTAGTTATACGTGTATAAAAGCGGCGCGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCG
ACCTGCAGGCATGCCCGTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATAATAATGTGTGAGTAGTTCCC
AGATAAGGGAATTAGGGTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCCTTAGTATGTATTTGTATTG
TAAATACTTCTATCAATAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGGGGTACCGAGCTCGAATTTCTAGTCTACGCGG
CCGCGAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGCGGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTCTGT
TGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCCTAATGAGT
GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCAGCTCGGGAAACCTGTGCGTCCAGCTGCATTAATGAA
TCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTTTCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTC
GTTCCGCTGCGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAA
GAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCC
CCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAAGCGTTT
CCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGG
AAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGC
ACGAACCCCGCTTCAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTA
TCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTG
GCCTAACTACGGCTACACTAGAAAGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
GTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA
AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTT
GGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATAT
ATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCC
ATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACC
GCGAGACCCACGCTCACCAGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTG
CACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC
AACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCTCAACG
ATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTA
AGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTT
TCTGTGACTGGTGAAGTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAAT
ACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAA
GGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACC
AGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACT
CATACTCTTCTTTTCAATATTATGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTT
AGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Fortsetzung Abbildung 5a

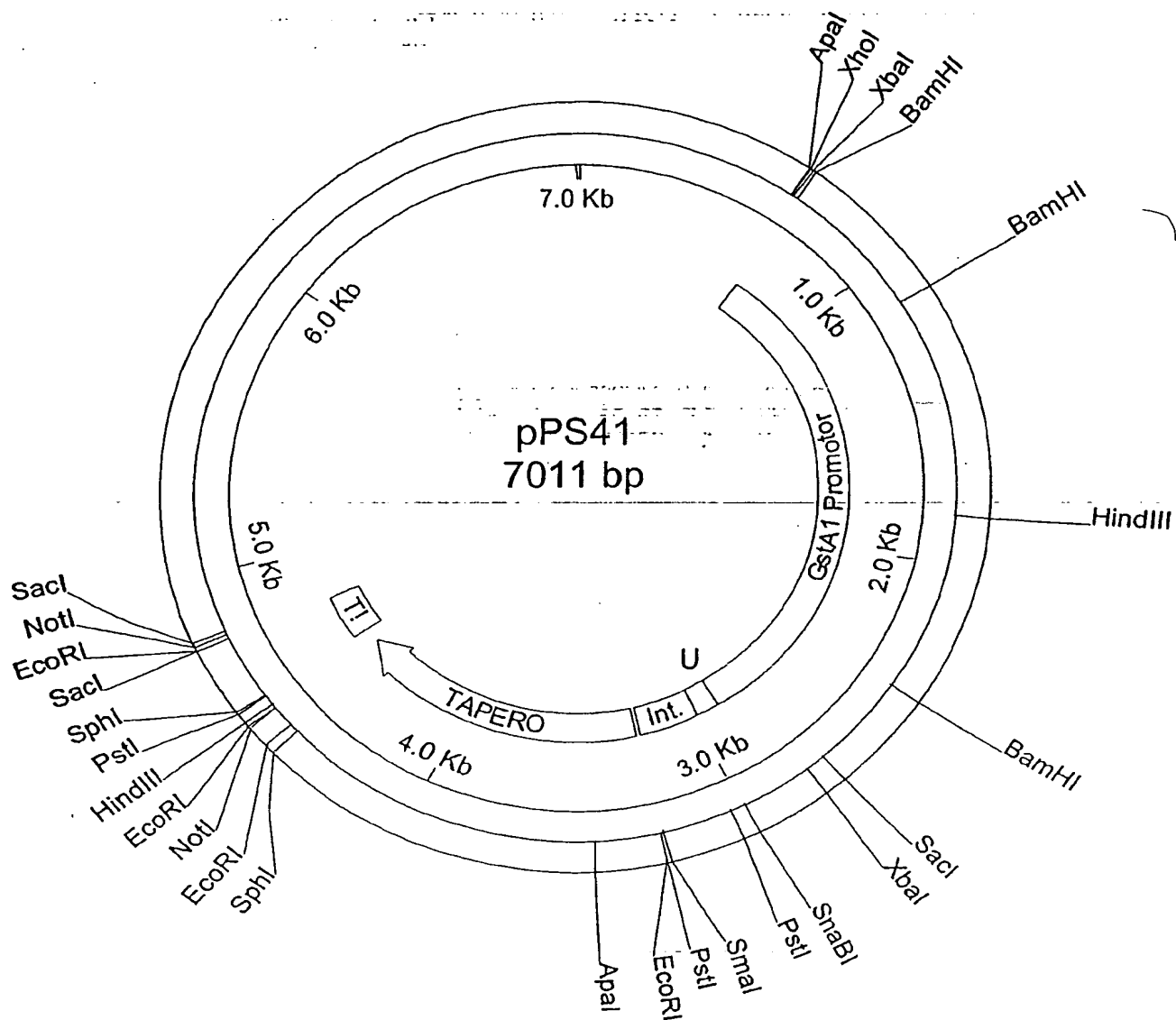


Abbildung 5b

Abbildung 6:

Germin 9f-2.8:

AGCTTATTACATAGCAAGCATGGGGTACTCCAAAACCCCTAGTAGCTGGCCTGTTGCAATGCTGTTACTAGCTCCGGCCG
TCTTGGCCACCGACCCAGACCCTCTCCAGGACTTCTGTGTCGCCGACCTCGACGGCAAGGCGGTCTCGGTGAACGGGCAC
ACGTGCAAGCCCATGTCGGAGGCCGGCGACGACTTCCTCTTCTCGTCCAAGTTGGCCAAGGCCGGCAACACGTCCACCCC
GAACGGCTCCGCCGTGACGGAGCTCGACGTGGCCGAGTGGCCCGGTACCAACACGCTGGGTGTGTCCATGAACCGCGTGG
ACTTTGCTCCCGGAGGCACCAACCCACCACACATCCACCCGCGTGCCACCGAGATCGGCATCGTGATGAAAGGTGAGCTT
CTCGTGGGAATCCTTGGCAGCCTCGACTCCGGGAACAAGCTCTACTCGAGGGTGGTGCGCGCCGGAGAGACGTTCCCTCAT
CCCACGGGGCCTCATGCACTTCCAGTTCAACGTGCGTAAGACCGAGGCCCTCCATGGTCGTCTCCTTCAACAGCCAGAACC
CCGGCATTGTCTTTCGTGCCCTCACGCTCTTCGGCTCCAACCCGCCCATCCCAACGCCGTGCTCACCAGGCACTCCGG
GTGGAGGCCAGGGTCGTGGAACTTCTCAAGTCCAAGTTTGCGCTGGGTTTAAATTTCTAGGAGCCTTCCCTGAAATGAT
AATTATATAATTCCATATATGCATGC

Eigenschaften von pPS24:

Sequenz:

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCC
AAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGATAAGACCGAGATAGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGATCCCA
CTATTAAGAACGTCGACTCCAACGCTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACC
CTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGAC
GGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCCCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
GTCACGCTGCGCGTAACACACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCCGCACTCAGGCTGCG
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGTTATGACGCCAGTGGCGAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT
TAAGTTGGGTAAACGTCAGGGTTTTCCCACTCAGCAGCTTTGTAACGACGCGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACT
TAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGTCTAGAACTAGTGGATCCCCGACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCC
AGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGACTGGATGACGAGCAGACCTGGTCTGGC
GGGTGTTGGGCGAGTAGAACACAGGGCGATGGCGACGCGTACCTTCTCCCCACCGCGATCTGCTCTTCTGGGT
GGGTGCGCGCTGACGTTCTGTTGGGGGTGGGGTGCCTGGCTGGCGTTCTGCTGCGGGGTGGGATGCGCCAGCCGG
GTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTGGCGAAGAGATCCGAGTCTTGGGGAGAT
CAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGGGCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGG
CTGCTAGCTAGGAACCTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGCTAAGTACTTTAACTTTCTCTTCCACA
TCCACCTGATTAGATATTTTGTATCAATTAATTCGAAATAATATGTGTATATCCACTACTATAATGTCTTAC
AATCAAATTATATGTAATTTTTTTAGTTTGAAGATTTATATGCACAGTAATCTGAATGTTCTTCACATGCATGATT
TAGTTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAAGTCTGTGATAAGAGATCTTTGGAGCAACACCAACCTCGTGAGGTGTTT
TGCCACGGAAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTTAGGATCAAAGTTGTAGGATAAACGTAACCTTCTCGATGTA
TCTTTTATACAACATTGTAGTTTGTATATATGGAGAGAGTGATTTAAACATTTGTGTTTAAAGATAGAATAAGTTATT
CCACCTCTAGCCAAACGAACATTATTTGGCAAATATCTCGTAGCTGGTGAGAGCCAGCGCTGGAAAGTCTGCTGTCT
ATAAGGCAACAGCATCAACAGGAACATTAGAGCCATGGAAAGTGATGTGTGCGCTACCAATGGGCAACTGCTAGC
GATGTAATAATAGCATCAAAGTTGATTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGCAAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCA
AGCTTAACTCTCGGAACCTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAAGATTAACCAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAA
AATTTATTTAGTTGAGTACAAACGAAATCATATTTGGAATGTACATTTCTGTTGATTTAAATAGAGGCATTTTCTA
CCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCTTAGTGCTTTTCGAGACACGAGAGGGACATGCTTTTTGGTGT
ACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCGCGTTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTA
GCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTCGGCAGCCGGATAGCCGCCATGCATGTAAAGTCTCTTTACCTTTACACTTG
CTCAAGTGACATGTATGTGCGCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGCTAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATT
TACAGTGTTTGTGCTACAGTTCTGACTTTGTTTCTTCACTTTTAGACTAGCTGACTGCTGCTTACCTGCCTTCCCTT
CTCCACGTTTAGGAGTACGAGTTCTGATATTGAGACTCGACGATGGGAGGAAGGGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAA
TTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTTGGTCTTACCAGATGTTTGGGGGGCTGTGCGAAATTGGTTCGCGATCTACA
AAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGCACGCTGTTTCTAAGTACTTACTTCTTCCGACC
ACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTACCGGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTA
ATTTGGCACTCATCATTTATATCTTTTTTGGTAGAAGATGAATAAAGCAGATGTAGACATAGCTAAAAAGTCGATG
TAGCCTTGTTATTTCTTGGGGCACGCGGGCCGGTGTGGTGCTCCCTGCTCTGTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAG
GCCTCCTCCACACACACACGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCTCCAGTATCTGCCCTCTCTGCTGCTGCTAGAGC
ATCCATCACGTGAAGTTCACGGACAACACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTGAAACCTCGCTCGAAACGCACCTGCAGA
TCGCTCTCTTCGTCGTCGCGCGCGATCATCAACAGCTCCGTTGCTTGGAGCCACGGCCCTCCACGACGCGCCG
GCCTCAGGTGAGTCGTCGGACGGTTCGGTTCAATTTCTCCCAATTTTGTAAATGATTAACCTGTTATACATGCTGAGC
TCGACCTGCTGAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACCCCGGGGATCAGCTTATTACATAGCAAGCATGG
GGTACTCCAAACCCTAGTAGCTGGCCTGTTGCGAATGCTGTTACTAGCTCCGGCGCTTGGGCCACCGACCCAGACCT
CTCCAGGACTTCTGTGTCGCGGACCTCGACGGCAAGCGGCTCGGTGTAACGGGCACACGTCGAAGCCCATGTGCGGAGC
CGGCGACGACTTCTCTCTGTTCCAAGTTGGCCAGGCGGCAACAGCTCCACCCGACCGCTCCGCGTGCAGCGGAGC
TCGACGTGGCGGACGATGGCCGGTCAAACACGCTGGGTGTGTCATGAACCGCTGGAATTTGCTCCGAGGACCAAC
CCACCACACATCCACCCGCGTGCCACCGAGATCGGCATCGTGATGAAAGGTGAGCTTCTCGTGGGAATCCTTGGCAGCCT
CGACTCCGGGAACAAGCTCTACTCGAGGGTGGTGCAGCGCGGAGAGAGCTTCTCATCCACGGGGCTCATGCACTTCC
AGTTCAACGTCGGTAAGACCGAGGCCCTCCATGGTTCGCTCTCTTCAACAGCGAGAACCCCGGCAATGTCTTCGTCGCCCTC
ACGCTCTTCGGCTCCAACCCGCCATCCCAACGCGGTGCTCACCAAGGACCTCCGGTGAGGCGAGGCTCGGGAACCT
TCTCAAGTCCAGTTTGGCGCTGGGTTTTAATTTCTAGGAGCTTCCCTGAAATGATAATTTATATAATTCATATATGCA

10/22

TGCCTGCAGGCATGCCCGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATAATAATGTGTGAGTAGTTCC
CAGATAAGGGAATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCCTAGTATGTATTTGTATTT
GTAAAACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAAACCAAATCCAGGGGTACCGAGCTCGAATTTCTAGTCTACGCG
GCCGCGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT
GTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG
TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGA
ATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGT
CGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAA
AGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGC
CCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT
TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGG
GAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTG
CACGAACCCCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTT
ATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGT
GGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTT
GGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAA
AAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTT
TGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA
TATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATC
CATAGTTGCCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATAC
CGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACACGACCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCCT
GCAACTTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTTCG
CAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAAC
GATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGT
AAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTT
TTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAA
TACGGGATAATACCGCGCCCATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCA
AGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCAACCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTCAC
CAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATAC
TCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATT
TAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Fortsetzung Abbildung 7a

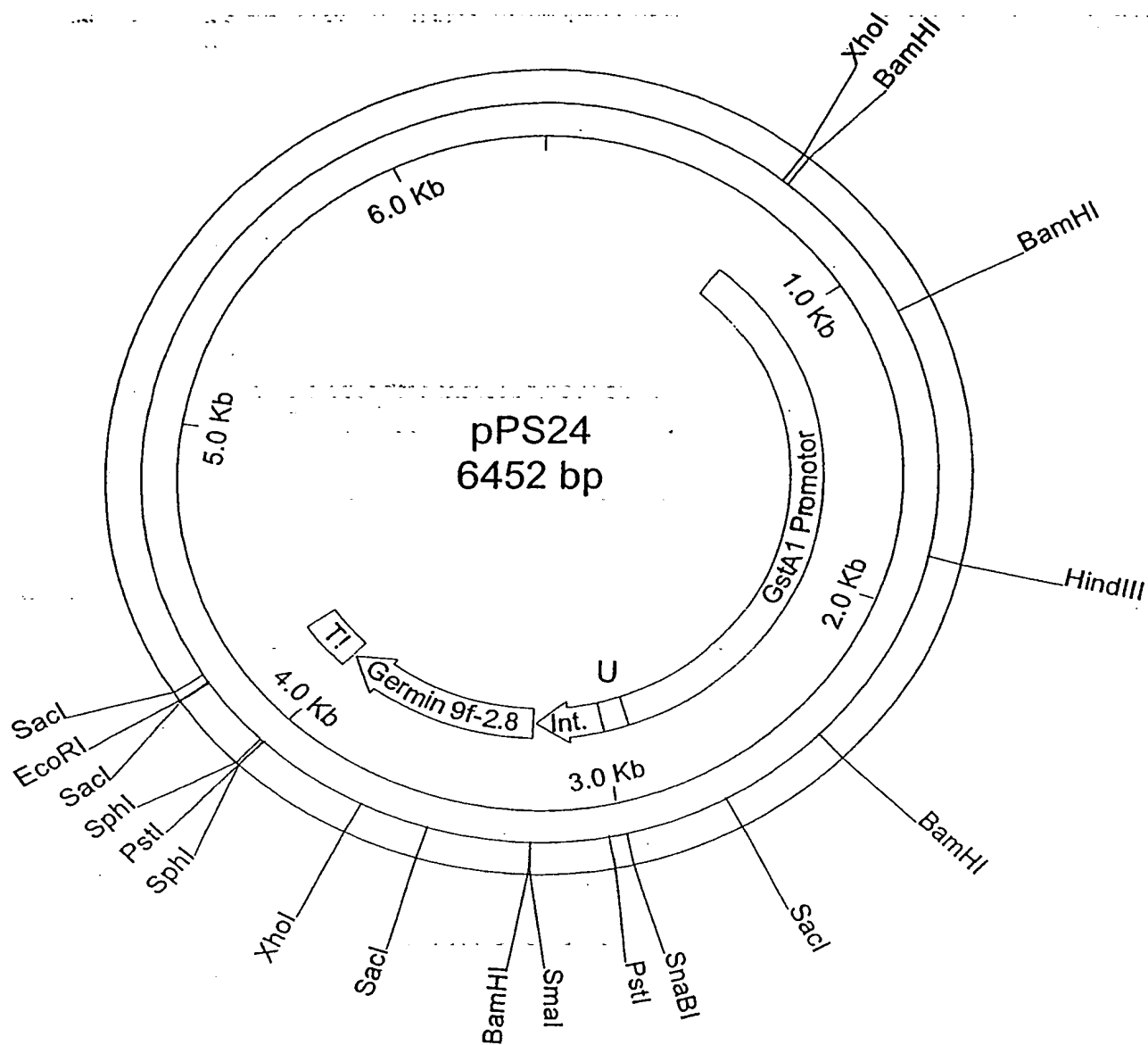


Abbildung 7b

Abbildung 8:

TaMlo inverted repeats and MlaI Intron:

CCACTGTCCACACGAAATGTGCCATCTGAAACGCGTTCTGGAACAGCGTCAGGTGTATGAAGAAGAGGACCCAGTCGGGG
CGGTGGAACCAGAAGAACTTGTGTCTGGGCTCGACCACGGGTGCCCTTGTATGACGCTCGACCGGTCTGGATCTCCAG
GGCCATCTCCATGATGATCATCTCTAGCTTGGTTCCAACACACAAGAGGATGATGAGAGGGATGAAAGAAACCCAGGTGA
GTGTGCCGATCCCGTCGATATCAAGGAAGAGGGTGAGGATCGCCACAGCCCACAGCGGGAGGCTGCCAAAAGAGGCCAAA
TGTGTCAAGATCATGCAACAAGGACCAGCAGGGGCAAAGACCATGACGCAGCAAACCTGATAGTATTGTATCATATGGAAG
CTAAGCAATATCATATGGAGCCTGACGACACTCGTGCCGAATTCGATTTCGTGAATTTCTAGAGAACAAAAGGTATGCATC
AATTTAGAAAAAAGTACACTATTATGTGATGTTTGTTCCTATGCTAGTGGAACGGATTAGAATTTTTTTTTTCATTAAGG
TCACCTTTACTGGCATAAGCAGTTCACACTAAACGGTAAACCTTATAGGTGAAAATTTTCAGGCATATATATATATATAT
ATATATATATATGTTTGATTCTTTCGGCTTAACAAAATAATTAGCAAGTACTTCTTGTTCGATTTGTTCCAACGGCTGA
ATTTATTGGCATCGGTCCAAGAAATCCATCTAAATGTTTTACATTTACCCAAAGTGTGTGTCATGACAGATGTAACAAAT
AATAAACAAAAGGAGAGGAAGGAAAGAGGAAGATAAATGTTACAAAAATTTAAATCAAACCTTATTTCTACCTTTCTCCT
TACCTACCCAGTTTAAAAACACATATTATATTTTAAAGAGAGGCAACATGCGCCAAAGGCTACCTTGAAAATTCCTAAA
ATATTGTACATTTGACTGATGACCAACAAAAAGTTAAATGTCTCTTCTTATCACATTATATTTCCATGCATGCCTTT
TTCTGGAACCTTACTATCAGCAAAATTTAGATGAAAGGATAATGCCACATAATTTAGTCTCCAAGAGATTTGTTAGTTG
TCATATATTAAATTTGGTGGGCCAATCTATTCCTGGGTCTTTTTATGTATCTACTTGACCATTTGAACTTCTGTAGTTAAT
TGTATTCTATGAATGATCACTCATCCAAAACTTGTTATTTGTGTTTTACTCTGTTGAATCTTGAATATTTATTCATTTT
GTTTCATCATACGATTGGAGGCCATAATAGATGCTTAATGAGAGTAAGATTATCGATCTCCAAACACATGCTTCTTACTA
GTGTTGAATATATACCTTTTAGATGTATAGTTCAACCCATAGATTATATGACCCTCAGCTTTCTGATGTGTATGTATG
ACCTTACACTGACACTCTGAACTAATGTAGGTATCTTGTCTGCAGGAATTCGGCACGAGTGTGCTCAGGCTCCATATGA
TATTGCTTAGCTTCCATATGATACAATACTATCAGTTTGTGCGTCATGGTCTTTGCCCTGCTGGTCTTGTGTCATGA
TCTTGACACATTTGGCCTCTTTTCGAGCCTCCCGCTGTGGGCTGTGGCGATCCTCACCTCTTCTTGTATCGACGGG
ATCGGCACACTCACCTGGGTTTCTTTTCATCCCTCTCATCATCCTCTTGTGTGTTGGAACCAAGCTAGAGATGATCATCAT
GGAGATGGCCCTGGAGATCCAGGACCGGTCGAGCGTCATCAAGGGGGCACCCGTGGTCGAGCCCAGCAACAAGTTCTTCT
GGTTCCACCGCCCGACTGGGTCTTCTTTCATACACCTGACGCTGTTCCAGAACGCGTTTCAGATGGCACATTTTCGTG
TGGACAGGCATGCGACTGG

Gesamtlänge:	7633 bp
vector Backbone: pBluescript SK+, ganzes Konstrukt zwischen XhoI und SacI Schnittstellen.	
GstA1 Promoter:	694-2891
Transcription start:	2892
GstA1 5' UTR	2892-2988
WIR1 5' UTR (part)	2989-3034
WIR1 part of 5' CDS + Intron	3035-3246
TaMlo IR1	3252-3556
Intron Mla1	3698-4731
TaMlo IR2	4877-5190
CamV 35S Terminator:	5191-5391

Sequenz:

CTAAATTGTAAGCGTTTAATATTTTGGTTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTGATTTTTTAAACCAATAGGCCG
AAATCGGCCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGTTGTAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGATGCCA
CTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGCTCAAAGGGCGAAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACC
CTAATCAAGTTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCCCGATTAGAGCTTGAC
GGGGAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAACGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
GTCACGCTGGCGGTAAACCACCAACCCGCCGCTTAAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCCGCATTTCAGGCTGCG
CAACTGTTTGGGAAGGGCGATCGGTGGCGGCGCTTCTCGCTATTCAGCCAGCTGGCGGAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT
TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACT
TAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGTCTAGAACTAGTGGATCCCCGACGCCGAAGTGGAGCGACAGCCCCC
AGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACATAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGACTGGATGACGAGCAGCCACTGGTCTGGC
GGGTGTTGGGCGAGTAGAACACAGGGCGCATGGCGACGCGTACCTTCTCCCTACCCGCGCATCTGCTCCTTCTGGGT
GGGTGCGCGGCTAGCTTCTGTGTCGGGGTGGGGTGCCTGGCTGGCGTTCTGCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGC
GTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTGGCGAAGAGATCCGAGTCTTGGGGAGAT
CAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGGGCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGG
CTGCTAGCTAGGGAACCTGGATCTCGGAACCTGGAGGAGGCCAAGTCGGGTATGCTAAGTACTTAACTTCTCTTCTACA
TCCACCTGATTAGATATTTTGTATCTAAATTAACCTTGCAAAAAATATATGTGTGATATCATCTACTATTAATTGCTTAC
AATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTAGAAGATTATATGCACAGTAAATCTGAATGTTCTTCACATGCATGATT
TAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAAGTCTTGATTAAGAGATCTTTGGAGCAACACCAACCTCGTGAGGTGTTT
TGCCACGGAAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATAGGATCAAAGTTGTAGGATAAACCGTAAACCTTCTCGATGTA
TCTTTTATACAACATTTGAGTTTAGTTTATATATGAGAGAGTAGATTAAACATTTGTGTTTAAAGATAGAATAAGTTATT
CCACACTCTAGCCAAACGAACATTTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAGCCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCT
ATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAAGTGATGTGTCGCTACCAATGGGCCAACTGCTAGC
GATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGCAAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCA
AGCTTAACTCTCGGAACCTTATAGACTTCAACTGAATCAGAACAGAAATAAAAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAA
AATTATTCAATTGAGTGACAAACGAAATCATATTTGAAATGTACATTTACTGTTGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTA
CCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTTTCGAGACACAGAGAGGGCACATTGCTTTTGGTGCT
ACCATCTCTCTCAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTCCCGCGTTGGAATATCGTGCCTGGTAGAGCTA
GCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTGCGGACCGGATAGCCGCCATGCATGTAAGTCTCTTTACCTTTACACTTG
CTCAAGTGACACTGATGTGCGCTACCACCTTGCTAAATCAATGGGCAACTGCTAGCGAGCTAATAGTAGCAAGTTGATT
TACAGTGTTTTGCTACAGTTCTCTGACTTTGTTTCTTCATTTTAGACTAGCTGACTACTGTGCTTACCTGCCTTCCCTT
CTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAGGGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAA
TTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCTTACCAGATGTTTGGGGGGCTGTCGGAATTTGGTTCCGCGATCTACA
AAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGACAGTGTGTTCTAACTAGACTTACTTCTTCGCAAC
ACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACATAACAAAGATGATTACTTACCGGCTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTA
ATTTGGCACTCATCATTTTCATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAGATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATG
TAGCCTTGTATTATTCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCTGTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAG
GCCTCCTCCCACACACACGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTGTCTCCAGTATCTGCCCTCTCCTGCTGCTGTAGAGC
ATCCTACAGTGAGTTACCGGACAACTACGTAACAGGACAGGACAGTCTCGAAACCTCGTGGAAACGCACTGCGAGA
TCGCTCTCTCTGCTGCTGCGCGCGATCATCATCAACAGCTCCGTTCTGCTTGGAGCCACGGCCGTCCACGACGCCGCC
GCCTCAGGTCAGTCGTGCGACGGTGTCCGTTTCATTTCCTCCCATTTTTGTAATTGATTAACCTGTTATACATGCTGACC
TCGACCTGCTGAATAACGTCGCTCCATGTTTTCCGCTCCAGGCAACCCCGGCCAGCTGTCCACAGAAATGTGCCATCTGA
AACCGGTTCTGGAACACGCTCAGGTGATGAAGAAGAGGACCCAGTCGGGGCGGTGGAACACAGAAATGTTGCTGGG
CTCGACACGGGTGCCCTTGATGACGCTCGACGGTCTGGATCTCCAGGCGCATCTCCATGATGATCATCTCTAGCT
TGGTTCCAACACACAAGAGGATGATGAGAGGGATGAAAGAACCAGGTGAGTGTGCCGATCCCGTCGATATCAAGGAAG
AGGGTGAGGATCGCCACAGCCACAGCGGGAGGTCGCAAAAGAGGCCAAATGTGTCAAGATCATGCAACAAGGACCAGC
AGGGGCAAAGACCATGACGCGCAAACTGATAGTATTGTATCATATGGAAGCTAAGCAATATCATATGGAGCCTGACGAC
ACTCGTGCCGAATTCGATTCTGTAATTTCTAGAGAACAAAGTATGCATCAATTTAGAAAAAGTACACTATTATTGTGTA
TGTTTGTCTTCTATGCTAGTGGAAACGGATTAGAATTTTTTTTTTTCATTAAGGTACCTTTACTGGCATAAGCAAGTTCACAC

TAAACGGTAAACCTTATAGGTGAAAATTTTCAGGCATATATATATATATATATATATATGTTTGATTCTTTCCGGC
TTAACAAAATAATTAGCAAGTACTTCTTGTTCATTGTTTCCAACGGCTGAATTTATTGGCATCGGTCCAAGAAATCCAT
CTAAATGTTTTACATTTACCAAAGTGTGTGTCATGACAGATGTAACAAATAATAAACCAAGGAGAGGAAGGAAGAG
GAAGATAAATGTTACAAAAATTTAAATCAAACCTTATTTCTACCTTTCTCCTTACCTACCCAGTTTAAAAACACATATTAT
ATTTTAAAGAGAGGCAACATGCGCCAAAGGCTACCCCTGAAAATTCCTAAAATATTGTACATTTGACTGATGACCAACA
AAAAGTTAAATTGTCTCTTCTTATCACATTATATTCCATGCATGCCTTTTTCTGGAACTTACTATCAGCAAAATTTA
GATGAAAGGATAATGCCACATAATTCAGTCTCCAAGAGATTTGTTAGTTGTATATTAATTTGGTGGGCCAATCTAT
TCCTGGGTCTTTTTATGTATCTACTTGACCATTGAACTTCTGTAGTTAATTGTATTCTATGAATGATCACTCATCCAAA
AACTTGTATTATTGTTTACTCTGTGAATCTTGAATATTATTCAATTTTGTTCATCATACGATTGGAGGCCATAATA
GATGCTTAATGAGAGTAAGATTATCGATCTCAAACACATGCTTCTTACTAGTGTGAATATATACCCCTTTTATAGTGTAT
AGTTCAACCCATAGATTATATGACCCCTCAGCTTCTGTATGTATGTATGACCTTACACTGACACTCTGAACTAATGTA
GGTATCTTGTCTGCGAGGAATTCGGCAGCAGTGTCTCAGGCTCCATATGATATTGCTTAGCTTCCATATGATACAAATAC
TATCAGTTTGTCTGCGTCATGGTCTTTGCCCCGTGCTGGTCTTGTGTCATGATCTTGACACATTTGGCCTCTTTTCGAGC
CTCCCGCTGTGGGCTGTGGCGATCTCACCCCTCTTCTTGATATCGACGGGATCGGCACACTCACCTGGGTTTCTTTTAT
CCCTCTCATCATCTCTTGTGTGTTGGAACCAAGCTAGAGATGATCATCATGGAGATGGCCCTGGAGATCCAGGACCGGT
CGAGCGTCATCAAGGGGGCACCCGTGGTCTGAGCCAGCAACAAGTTCTTCTGGTTCACCGCCCCGACTGGGTCTCTTTC
TTCATACACCTGACGCTGTTCCAGAACGCGTTTCAGATGGCACATTTCTGTGTGGACAGGCATGCGACTGGGCATGCCCCG
TGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTATAAATGTGTGAGTAGTTCCAGATAAGGGAATTAGGGT
TCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCTTAGTATGTATTGTATTGTAAAATACTTCTATCAAT
AAAATTTCTAATTCTTAAACCAAAAATCCAGGGGTACCGAGCTCGAATTTCTAGTCTACGCGGCCGAGCTCCAGCTTTT
GTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTC
ACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAT
TGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCTGGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGA
GAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCG
GTATCAGCTCACTCAAAGGCGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCGAGGAAGAACATGTGAGCAAAAGG
CCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACA
AAAATCGAGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTC
GTGCGCTCTCTGTTCCGACCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGGCTGGCGCTTTCTCA
TAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTGTAGGTCTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAGAACCCCCCTTCAGC
CCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCC
ACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC
TAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA
AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGAT
CCTTTGATCTTTTCTACGGGCTGTACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAA
AAGGATCTTACCTAGTATCTTTTAAATTAAGGATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTG
ACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCC
GTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC
GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCA
TCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCT
ACAGGCATCTGTTGTCACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGCTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATG
ATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGCTCCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTAT
CACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTAC
TCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCC
ACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTTGGAACGCTTCTTCCGGGCGAAACTCTCAAGGATCTTACCCTGTTTGA
GATCCAGTTTCATGTAACCACTCGTGACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCA
AAAAAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCA
ATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAAATG
GGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Fortsetzung Abbildung 9a

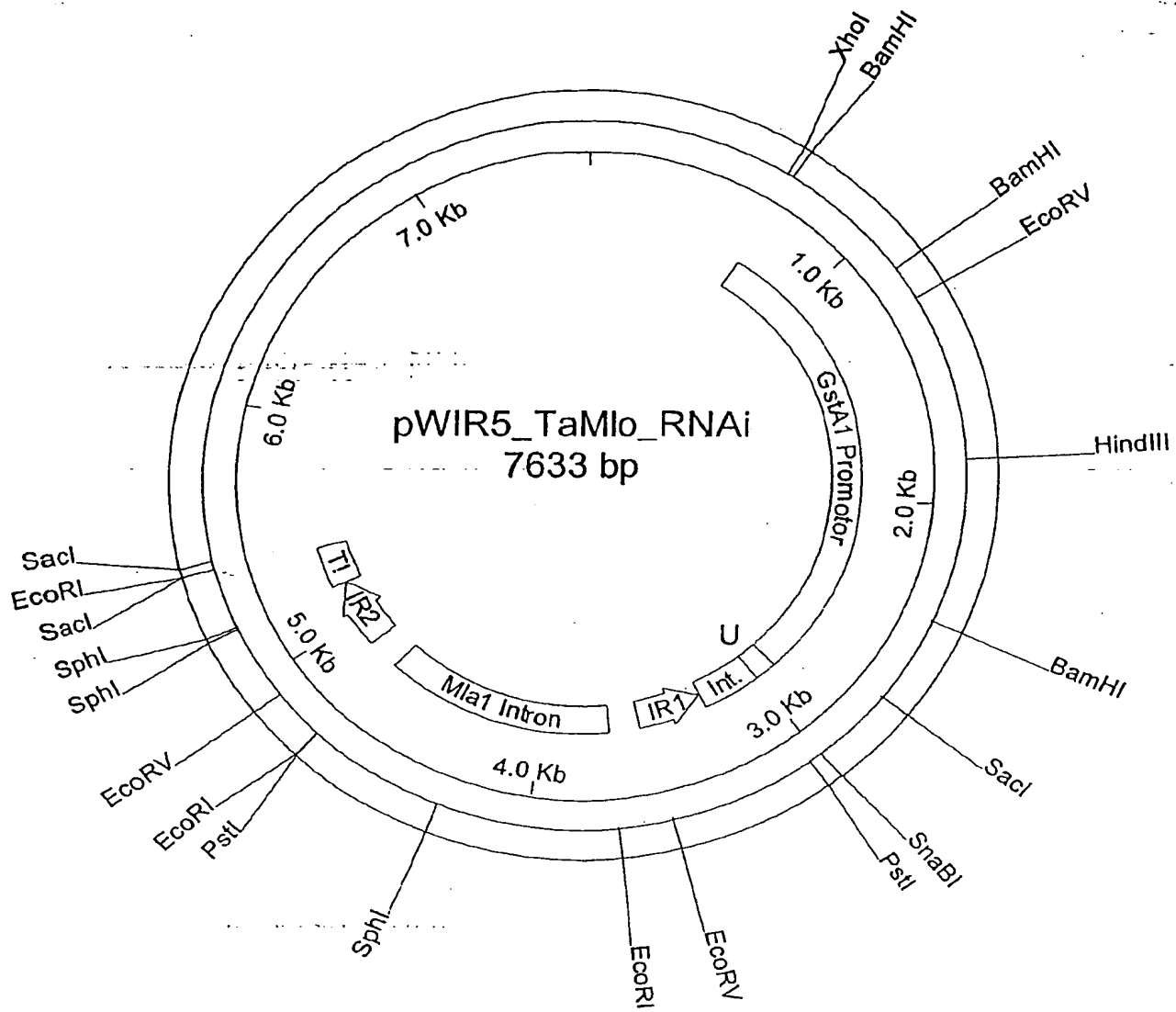


Abbildung 9b

Abbildung 10:

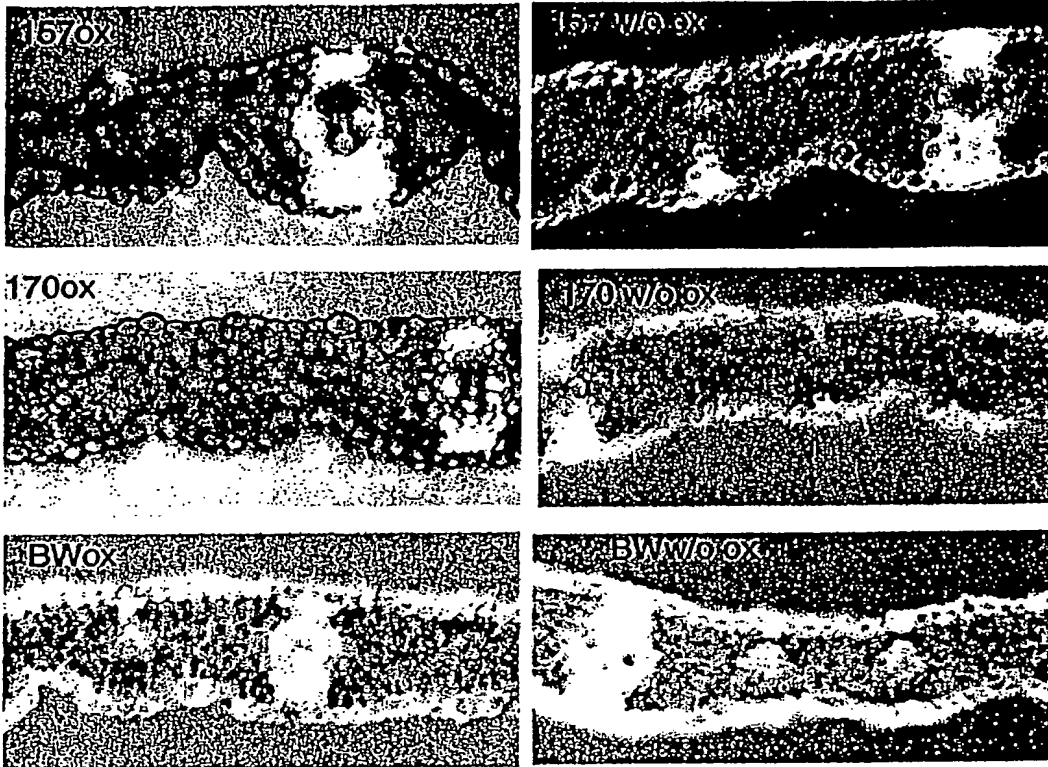
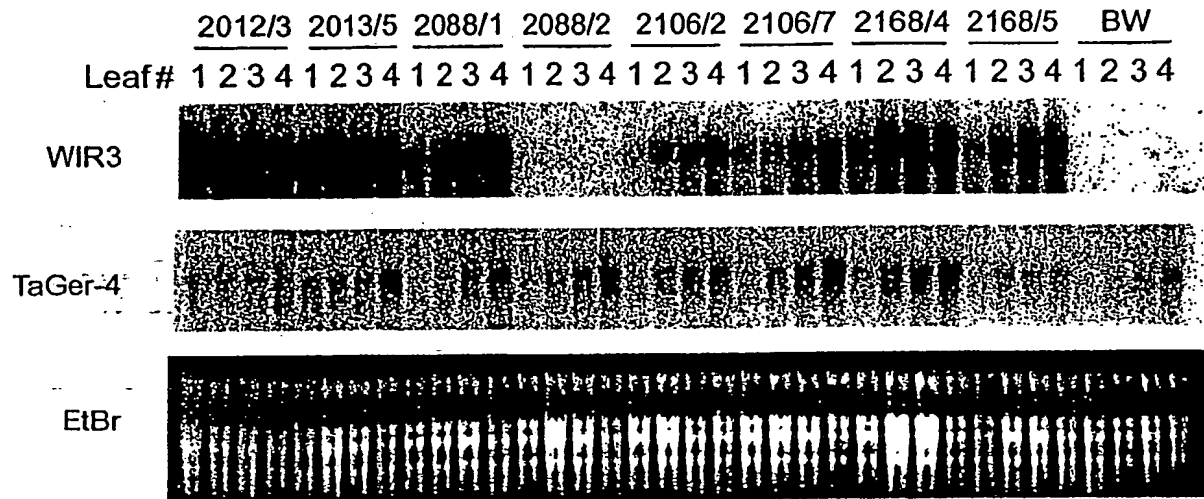


Abbildung 11:

a)



b)

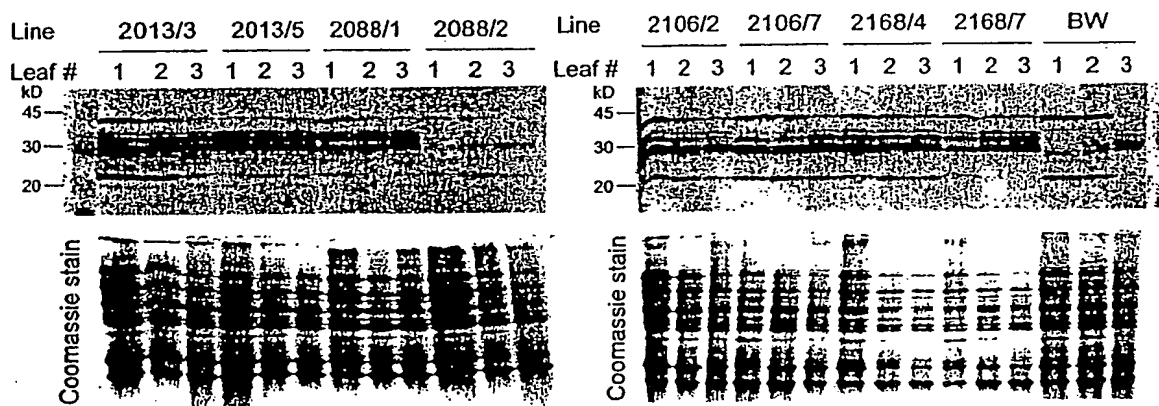


Abbildung 12

A

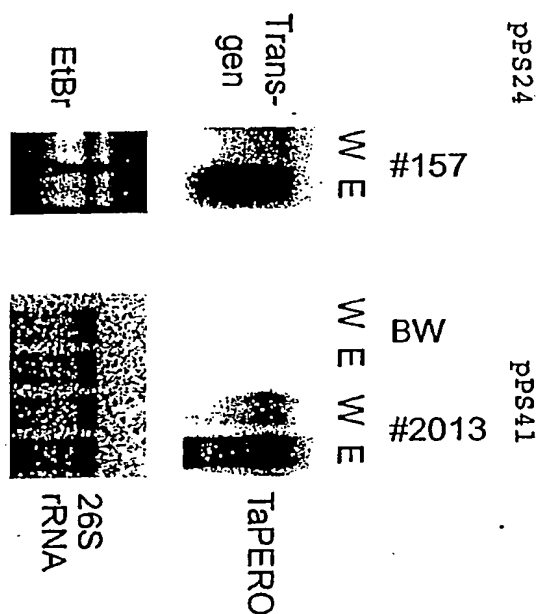
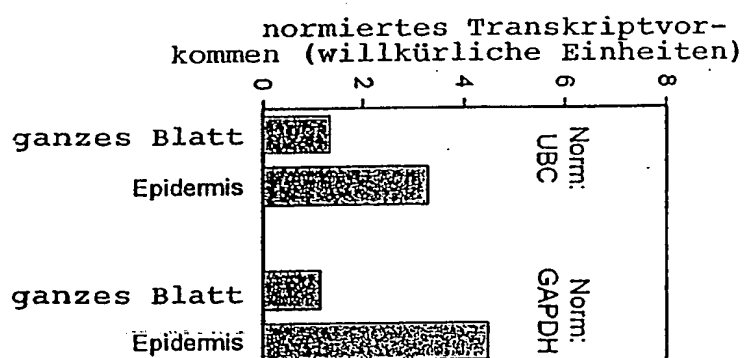


Abbildung 12

B



19/22

Abbildung 12 C

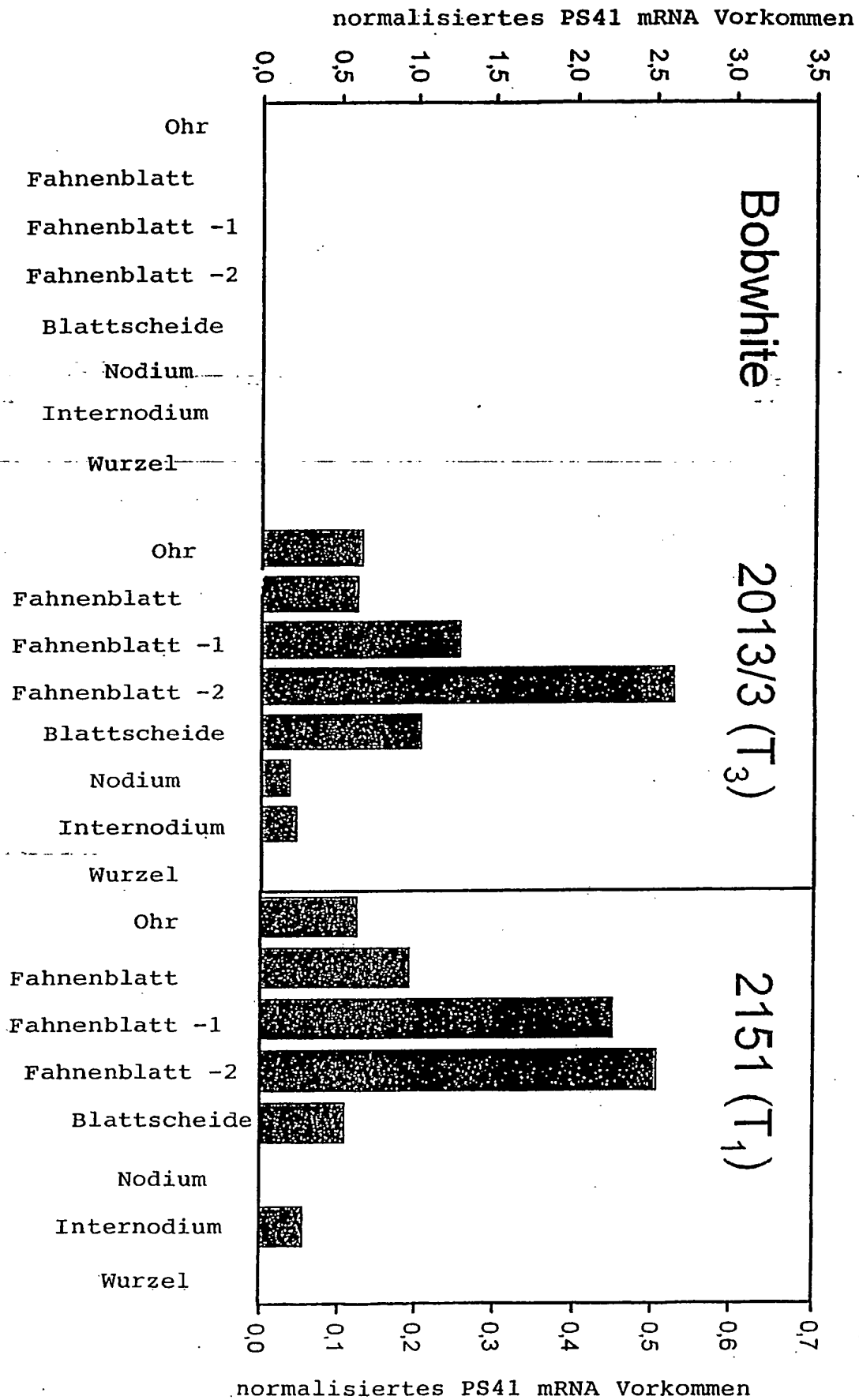
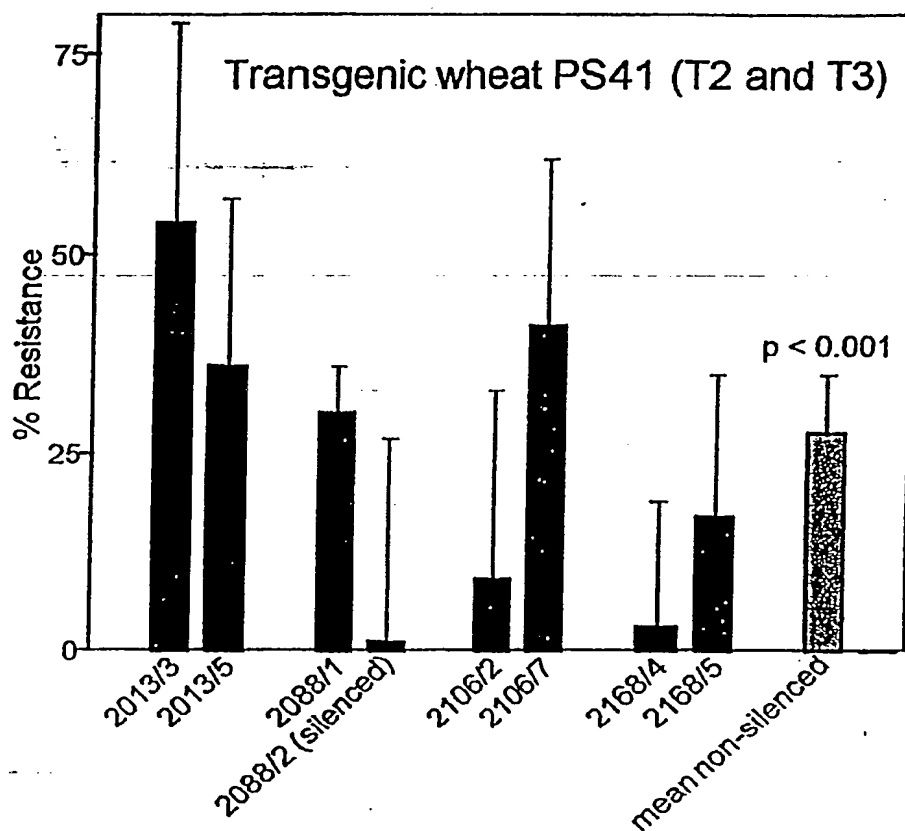


Abbildung 13

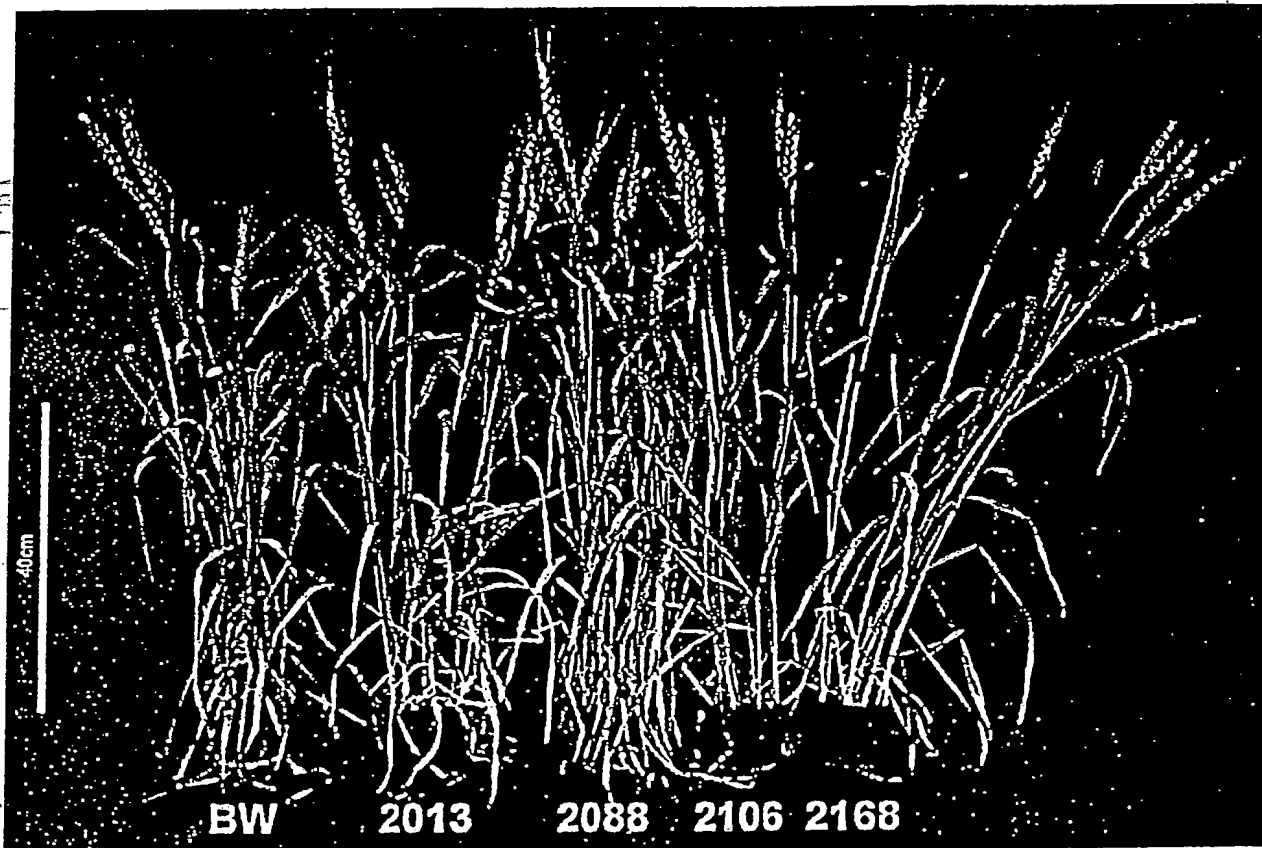
Mehltauresistenz von transgenen Weizenlinien, die das pPS41 Konstrukt tragen.



Das Fahnenblatt adulter Pflanzen wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inokuliert, zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inokulation wurde der Mehлтаubefall bonitiert. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Inokulationsexperimenten mit Pflanzen der T2 und T3 Generation. Sublinie 2088/2 exprimiert kein TAPERO und ist nicht erhöht resistent. Mean non-silenced = Mittelwert aus allen Linien außer 2088/2 und allen Experimenten.

Abbildung 14

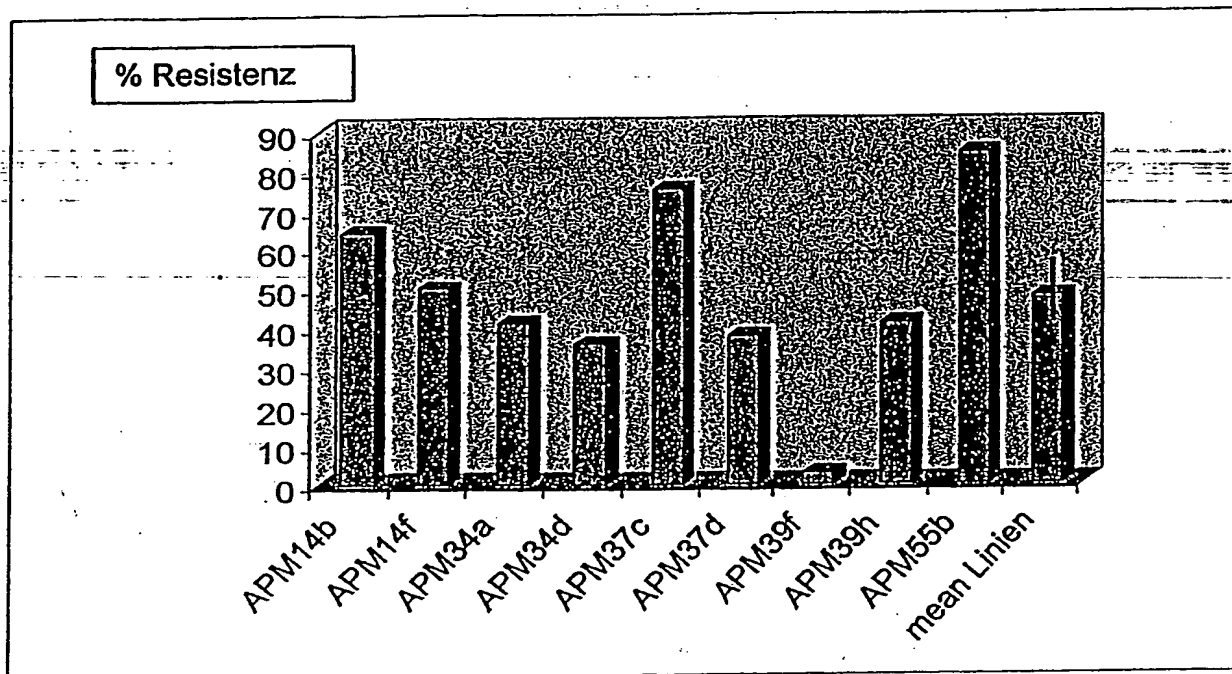
Normaler Wachstumsphänotyp transgener Pflanzen, die das pPS41 Konstrukt tragen.



Pflanzen der T2 Generation wurden zusammen mit Bobwhite Widtyppflanzen ausgesät und im Adultpflanzenstadium fotografiert.

Abbildung 15

Mehltauresistenz von transgenen Weizenlinien, die das pWIR5-TaMlo-RNAi Konstrukt tragen.



Das Fahnenblatt adulter Pflanzen der T2 Generation wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inokuliert, zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inokulation wurde der Mehлтаubefall bonitiert. Je 2 Sublinien pro Linie wurden getestet.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> IPK Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanze

<120> Promotor zur epidermisspezifischen Transgenexpression
in Pflanzen

<130> I 7469

<140> DE 103 46 611.8

<141> 2003-10-07

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2198

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 1

```
gacgccgaag tggagccgac agcccccagg tcccaagccc tcggcagact agatcactag 60
ccctggatcg gcgaggtgac tggatgacga gcagcacctg gtctggcggg tgttgggcga 120
gtagaaccag gggcgatggc gacgcgctga ccttctcccc tcaccggcga tctgtctctt 180
ctgggtgggg gtgcgcggct gacgttctgt tgcggggtgg gggtcgccgg ctggcgttct 240
gctgcggggg gggagtcgcc gaccggcggt ctgctgctag gacaatcggg gaggccagtt 300
aggtgctagc cgatcgattg gcgaagagat ccgagtcctg gggagatcag tgaggccagg 360
tgctatttgg cctatcaatt ggccagggtc tgggaacggg gcgtggcgtg atcaacgagg 420
tgctaggctg ctagctaggg aactggatcc tggaaactgg aggaggcaag tccggtatgc 480
taagtacttt aactttcctt cttcacatcc acctgattca gattattttg atctaaatta 540
acttgcaaaa aatataatgt tgatatccat ctactataat tgcttacaat caaaattata 600
tgtgattttt tttagtttag aagatttata tgcacagtaa atctgaatgt tcttcacatg 660
catgatttag ttttaacttta aagagttata ctaactagtc ttgataaaga gatcttttgg 720
agcaacacca aacctcgtga ggtgttttgc ctacggaaag gttgtgctat gtaatgatta 780
ttattagatg caaagttgta ggataaacgt aaaaccttct cgatgtatct tttatacaac 840
attgtagttt agttatataat ggagagagtg atttaacact ttgtgtttta gagtagaata 900
agttattcca cactctagcc aaacgaacta tttggcaaat atctcgctag ctggtgagag 960
ccagagccgt ggaaagtctg tcttgctatt aaggcacaag catcaaacag gaacatttag 1020
agccatggaa aagtgatgtg tcgcctacca atgggccaac tgctagcgat gtaataatag 1080
catccaagtt gattttttat agaacatgca aggcgttggc aagtgggaaa atgattgatc 1140
gctggcaagc ttaactctcg gaacttatag cattcaactg aatcagaaca aagattaaaa 1200
aaaaatacat ttccatcgat agtgaaaaat tattcaattg agtgacaacg aaaatcatat 1260
tggaatgtac atttacttgt tgatttttaa ttagaggcat ttttctacct tttttagtta 1320
ataagatatg catataccca cccttagtgt tttcgagaca acgagagggc acattgcttt 1380
tggtgctacc atctctctca agcctcaaat aagttgtgcy gacacgatta tcttcccgcy 1440
ttggaatate gtggcctggt agagctagcg aaaaatcttc catgttgga tatgtcggca 1500
gccgtagatg cgcctatgat gtaaagtctc ttttaccttt acacttgctc aagtgcact 1560
gtatgtcgcc taccacttgc taaatcaatg ggccaactgc tagcgacgta atagtagcaa 1620
gttgatttac agtggttttgc tacagttctc tgactttgtt tcttcatttt agactagctg 1680
actactgtcg cttacctgcc ttcccttctc cacgttagag gatccagttc tgatatttag 1740
acctcgacga tgggaggaag ggcgcgatcg atgtggagta atttgaattt caaatctatc 1800
tatctggggg atattggtcc ttcaccgatg tttggggggc tgtcggaaat tggttccgcy 1860
atctacaaaa gtgaattggg ggagtagttg tttctccaat ccgtaccaac gcacgtgttt 1920
ctaactagta cttacttctc tcgcaccaca atatggaata gagggagtat cgataaacta 1980
acaaagatga ttacttaacc ggtttaaatg attcaagagc tcatttaatt tggcactcat 2040
catttcatat atcttttttg gtagaaatga aataaagcag atctagacac tagctaaaaa 2100
gtcgatgtag ccttggtatt tccttgggcy acgcggggcy ggtgtggtgc tccctgctct 2160
gtgtataaat ggagatcaac atccaaggcc tcctccca 2198
```

<210> 2

<211> 114

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 2

```
gtcagtcgtc ggacgggtgtc cgttcatttc ctccccattt ttgtaattga ttaacttgtt 60
atacatgctg acctcgacct gctgaataac gtccgtccat ggtttcccgt ccag 114
```

<210> 3

<211> 2553

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 3

```
gacgccgaag tggagccgac agccccagg tcccaagccc tcggcagact agatcactag 60
ccctggatcg gcgaggtgac tggatgacga gcagcacctg gtctggcggg tgttgggcga 120
gtagaaccag gggcgatggc gacgcgctga ccttctcccc tcaccggcga tctgctcctt 180
ctgggtgggg gtcgcccgtt gacgttctgt tgcgggggtg gggtcgccgg ctggcgcttc 240
gctgcggggg gggagtcgcc gaccggcggt ctgctgctag gacaatcggg gaggccagtt 300
aggtgctagc cgatcgattg gcgaagagat ccgagtcctg gggagatcag tgaggccagg 360
tgctattttg cctatcaatt ggccagggtt tgggaacggg gcgtggcgtg atcaacgagg 420
tgctaggctg ctgctagggt aactggatcc tggaaacgtg aggaggcaag tccggtatgc 480
taagtacttt aactttcctt ctccacatcc acctgattca gattattttg atctaaatta 540
acttgcaaaa aatatatgtg tgatatccat ctactataat tgcttacaat caaaattata 600
tgtgattttt tttagtttag aagattttata tgcacagtaa atctgaatgt tcttcacatg 660
catgatttag ttttaacttta aagagttata ctaactagtc ttgataaaga gatcttttgg 720
agcaacacca aacctcgtga ggtgttttgc ctacggaaaag gttgtgctat gtaatgatta 780
ttattaggat caaagtgtga ggataaacgt aaaaccttct cgatgtatct tttatacaac 840
attgtagttt agttatata ggagagagtg attttaacact ttgtgtttta gagtagaata 900
agttattcca cactctagcc aaacgaacta tttggcaaat atctcgctag ctggtgagag 960
ccagagccgt ggaaagtctg tcttgctatt aaggcacaag catcaaacag gaacatttag 1020
agccatggaa aagtgatgtg tcgcctacca atgggccaac tgctagcgat gtaataatag 1080
catccaagtt gattttttat agaacatgca aggcgttggc aagtgggaaa atgattgatc 1140
gctggcaagc ttaactctcg gaacttatag cattcaactg aatcagaaca aagattaaaa 1200
aaaaatacat ttccatcgat agtgaaaaat tattcaattg agtgacaacg aaaatcata 1260
tggaatgtac atttacttgt tgatttttaa tttagggcat ttttctacct ttttttagtta 1320
ataagatatg catataccca cccttagtgt tttcgagaca acgagagggc acattgcttt 1380
tggtgctacc atctctctca agcctcaaat aagttgtgcg gacacgatta tcttcccgcg 1440
ttggaatate gtggcctggt agagctagcg aaaaatcttc catgttgga tatgtcggca 1500
gocggatagc cgccatgcat gtaaagtctc ttttaccttt acaacttgctc aagtgcact 1560
gtatgtcgcc taccacttgc taaatcaatg ggccaactgc tagcgacgta atagtagcaa 1620
gttgatttac agtgtttgc tacagttctc tgactttgtt tcttcatttt agactagctg 1680
actactgtcg cttacctgcc ttcccttctc cagcttagag gatccaagttc tgatattgag 1740
acctcgacga tgggaggaag ggcgcgatcg atgtggagta atttgaattt caaatctatc 1800
tatctgggtt atattgtcc ttcaccgatg tttggggggc tgcggaaat tggttccgcg 1860
atctacaaaa gtgaatggag ggagtagttg tttctccaat ccgtaccaac gcacgtgttt 1920
ctaactagta cttacttctt tcgcaccaca atatggaata gagggagtat cgataaacta 1980
acaaagatga ttacttacct ggttttaaat attcaagagc tcatttaatt tggcaactcat 2040
catttcatat atcttttttg gtagaaatga aataaagcag atctagacac tagctaaaaa 2100
gtcgatgtag ccttgttatt tccttggggc acgcggggcg ggtgtggtgc tccctgctct 2160
gtgtataaat ggagatcaac atccaaggcc tctccaca cacacacgct acagagcaga 2220
gcagagtctt gctccagtat ctgccctctc ctgcctgcct gtagagcatc catcacgtga 2280
agttcacgga caaactacgt acacaggcag ctagctctcg aaacctcgct cgaaacgcac 2340
ctgcagatcg ctctcttctg cgtcgtcgcc gcgatcatca tcaacagctc cgtctgcctt 2400
ggagccacgg cgtccacga cgccgcgcgc tcaggtcagt cgtcggacgg tgtccgttca 2460
tttctcccc atttttgtaa ttgattaact tgttatcat gctgacctcg acctgctgaa 2520
taacgtccgt ccatggtttc ccgtccagge acc 2553
```

<210> 4

<211> 1246

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 4

accaccacac	cactccacca	gtaagaagtg	cagcaggtag	ctagtaagcc	ggcgtagctt	60
tgctcttgca	gctagctagc	taaccatggc	cgctctgccc	tcttgccctt	ctcttggtgt	120
gctcgtggct	ctggccacgg	cggcgtcggc	gcagctgtca	ccgaccttct	acgacacgtc	180
ctgccccagg	gccctggcca	tcatcaagag	tggcgtcatg	gccgccgtga	gcagcgaccc	240
tcggatgggc	gcgtcgctgc	tccggctgca	cttccacgac	tgcttcgtcc	aaggctgcga	300
cgcgtctgtt	ttgctgtctg	gcatggaaca	aaatgctatc	ccgaacgcgg	ggtcgctgag	360
gggcttcggc	gtcatcgaca	gcatcaagac	gcagatcgag	gccatctgca	atcagaccgt	420
ctcctgcgcc	gacatcctca	ccgtcgccgc	ccgtgactcc	gttgtagccc	tcggagggcc	480
gtcatggaca	gtccctctgg	ggagaagaga	ttccacagat	gcaaacgagg	cggcggcaaa	540
cagcgacctg	ccaggcttta	catctagccg	gtcagatctt	gagctggcat	tcagaaacaa	600
gggcctcctt	acgatcgaca	tggtggccct	ctcgggcgcg	cacaccatcg	gccaggcgca	660
gtgtgggacc	tttaaggaca	ggatctacaa	tgagactaac	atcgacacgg	ccttcgccac	720
atctctccgg	gccaactgcc	ccaggtcaaa	cggcgacggg	agcctggcga	acctggacac	780
gacgacggcc	aacacgttcg	ataacgccta	ctacaccaac	ctcatgtcac	agaaggggct	840
cctgcactcg	gaccaggtgc	tggtcaacaa	cgacaccacc	gacaacactg	tccggaactt	900
tgctcgaac	ccagcggcgt	tcagcagcgc	cttcacgacc	gccatgatca	agatgggcaa	960
catcgccggc	aagacaggca	cgcaggggca	gatcaggctc	agctgctcca	gggtgaactc	1020
gtgattgata	gacgagttac	tgcatactag	ccagcagcac	acgtacgtga	atgaataagg	1080
ccacagaacc	agtggccaat	ataaatacca	gctcttgaaa	ccgtgtattt	tatgtacgag	1140
tagcagcaaa	tcatgcatgc	atctacacat	atatatgtaa	cgatcgaatt	cccactttct	1200
catgcaaagg	catggagaat	tactatcaat	cttagttata	cgtgta		1246

<210> 5

<211> 7011

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 5

ctaaattgta	agcgttaata	ttttgttaaa	attcgcgtta	aatttttgtt	aaatcagctc	60
atTTTTtaac	caataggccg	aaatcggcaa	aatcccttat	aaatcaaaag	aatagaccga	120
gatagggttg	agtgttggtc	cagtttgtaa	caagagtcca	ctattaaaga	acgtggactc	180
caacgtcaaa	ggcgaaaaaa	cogtctatca	ggcgatggc	ccactacgtg	aaccatcacc	240
ctaatacaagt	tttttggggt	cgaggtgccc	taaagcacta	aatcggaacc	ctaaaggag	300
cccccgattt	agagcttgac	ggggaaagcc	ggcgaacgtg	gcgagaaagg	aagggaagaa	360
agcgaaagga	gcgggcgcta	gggcgctggc	aagtgtagcg	gtcacgctgc	gcgtaaccac	420
cacaccggcc	gcgcttaatg	cgccgctaca	gggcgctcc	cattcgccat	tcaggctgcg	480
caactgttg	gaaggcgat	cgggtcgggc	ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	540
gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	600
taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	cgactcaacta	tagggcgaat	tgggtaccgc	660
gccccccctc	gagtctagaa	ctagtggatc	cccgcgccc	aagtggagcc	gacagcccc	720
aggtcccaag	ccctcggcag	actagatcac	tagccctgga	tcggcgagg	gactggatga	780
cgagcagcac	ctgggtctggc	gggtgttggg	cgagtagaac	cagggcgcat	ggcgacgcgc	840
tgaccttctc	ccctcacccg	cgatctgctc	cttctgggtg	ggggctcgcc	gctgacgttc	900
tggtcgggg	tgggggtcgc	cggctggcgt	tctgctgcgg	ggtgggagtc	gpcgaccggc	960
gtgctgctgc	taggacaatt	ggtgaggcca	gttaggtgct	agccgatcga	ttggcgaaga	1020
gatccgagtc	ctggggagat	cagtgaggcc	aggtgctatt	tggcctatca	attggccagg	1080
ttctgggaac	ggggcggtggc	gtgatcaacg	aggtgctagg	ctgctagcta	gggaactgga	1140
tcctggaacg	tggaggaggc	aagtccgcta	tgctaagtac	tttaactttc	cttcttcaca	1200
tccacctgat	tcagattatt	ttgatctaaa	ttaacttgca	aaaaatatat	gtgtgatata	1260
catctactat	aattgctttac	aatcaaaatt	atatgtgatt	ttttttagtt	tagaagattt	1320
atatgcacag	taaatctgaa	tgttcttcac	atgcattgatt	tagtttaact	ttaaagagtt	1380
atactaacta	gtcttgataa	agagatcttt	tggagcaaca	ccaaacctcg	tgagggtgtt	1440
tgccctacgga	aaggttggtc	tatgtaata	ttattattag	gatcaaagtt	gtaggataaa	1500
cgtaaaacct	tctcgatgta	tcttttatat	aacattgtag	tttagttata	tatggagaga	1560
gtgatttaac	actttgtggt	taagagtaga	ataagttatt	ccacactcta	gccaaacgaa	1620
ctatttggca	aatatctcgc	tagctggtga	gagccagagc	cgtggaaagt	ctgtcttgct	1680
attaaggcac	aagcatcaaa	caggaacatt	tagagccatg	gaaaagtgat	gtgtcgcccta	1740
ccaatggggc	aactgctagc	gatgtaataa	tagcatccaa	gttgattttt	tatagaacat	1800
gcaaggcggt	ggcaagtggg	aaaatgattg	atcgctggca	agcttaactc	tcggaactta	1860
tagcattcaa	ctgaatcaga	acaaagatta	aaaaaaaata	catttccatc	gatagtga	1920

aattattcaa	ttgagtgcaca	acgaaaaatca	tattggaatg	tacatttact	tggttgatttt	1980
aaatttagagg	cattttttcta	ccttttttag	ttaataagat	atgcatatac	ccacccttag	2040
tgttttcgag	acaacgagag	ggcacattgc	ttttggtgct	accatctctc	tcaagcctca	2100
aataagttgt	gcggaacacga	ttatcttccc	gcgttggaat	atcgtggcct	ggtagagcta	2160
gcgaaaaatc	ttccatgttg	aaatatgtcg	gcagccgat	agccgccatg	catgtaaagt	2220
ctcttttacc	tttacacttg	ctcaagtgac	actgtatgtc	gcctaccact	tgctaaatca	2280
atggggccaac	tgctagcgac	gtaatagtag	caagttgatt	tacagtgttt	tgctacagtt	2340
ctctgacttt	gtttcttcat	tttagactag	ctgactactg	tcgcttacct	gccttccctt	2400
ctccacgtta	gaggatccag	ttctgatatt	gagacctcga	cgatgggagg	aagggcgcgga	2460
tcgatgtgga	gtaatttgaa	tttcaaactc	atctatctgg	ggtatattgg	tccttcaccg	2520
atgtttgggg	ggctgtcggga	aattggttcc	gcgatctaca	aaagtgaatg	gagggagtag	2580
ttgtttctcc	aatccgtacc	aacgcacgtg	tttctaacta	gtacttactt	ccttcgcacc	2640
acaatatgga	atagagggag	tatcgataaa	ctaacaaaga	tgattactta	cccgggttaa	2700
atgattcaag	agctcattta	atltggcact	catcatttca	tatatctttt	ttggtagaaa	2760
tgaataaaag	cagatctaga	cactagctaa	aaagtcgatg	tagccttggt	atltccttgg	2820
gccacgcggg	ccgggtgtgg	tgctccctgc	tctgtgtata	aatggagatc	aacatcccaag	2880
gcctcctccc	acacacacac	gtacacagag	agagcagagt	cttgctccag	tatctgccct	2940
ctcctgcctg	cctgtagagc	atccatcaag	tgaagttcac	ggacaaacta	cgtacacagg	3000
cagctagctc	tcgaaacctc	gtcggaaacg	cacctgcaga	tcgctctctt	cgtcgtcgtc	3060
gccgcgatca	tcacacacag	ctccgtctgc	cttgaggacca	cggccgtcca	cgacgcggcc	3120
gcctcagggtc	agtcgtcggga	cgggtgtccg	tcatttctct	ccattttttg	taattgatta	3180
acttggtata	catgctgacc	tcgacctgct	gaataacgtc	cgtccatgg	ttcccgtcca	3240
ggcaccccg	gctgcaggaa	ttcaccacca	caccactcca	ccagtaagaa	gtgcagcagg	3300
tagctagttaa	gccggcgtag	ctttgctctt	gcagctagct	agctaaccat	ggccgcctct	3360
gcctcttgcc	tttctcttgt	ggtgctcgtg	cgtctggcca	cggcggcgtc	ggcgagctg	3420
tcaccgacct	tctacgacac	gtcctgcccc	agggccctgg	ccatcatcaa	gagtggcgtc	3480
atggccgccc	tgagcagcga	ccctcggatg	ggcgcgtcgc	tgctccggct	gcacttccac	3540
gactgcttcg	tccaaggctg	cgacgcgtct	gttttgctgt	ctggcatgga	acaaaatgct	3600
atcccgaacg	cggggctcgt	gaggggcttc	ggcgtcatcg	acagcatcaa	gacgcagatc	3660
gaggccatct	gcaatcacag	cgtctcctgc	gccgacatcc	tcaccgtcgc	cgcccgtagc	3720
tccgttgtag	ccctcggagg	gccgtcatgg	acagtccttc	tggggagaag	agattccaca	3780
gatgcaaacg	aggcggcggc	aaacagcgac	ctgccaggct	ttacatctag	ccggtcagat	3840
cttgagctgg	cattcagaaa	caagggcctc	cttacgatcg	acatgggtgg	cctctcgggc	3900
gcgcacacca	tcggccaggc	gcagtgtggg	acctttaagg	acaggatcta	caatgagact	3960
aacatcgaca	cggccttcgc	cacatctctc	cgggccaact	gccccaggct	aaacggcgac	4020
gggagcctgg	cgaacctgga	cacgacgacg	gccaaacagt	tcgataacgc	ctactacacc	4080
aacctcattg	cacagaaggg	gtcctctgcac	tcggaccagg	tgctgttcaa	caacgacacc	4140
accgacaaca	ctgtccggaa	ctttgcgtcg	aaaccagcgg	cgttcagcag	cgccttcacg	4200
accgccatga	tcaagatggg	caacatcgcg	ccgaagacag	gcacgcaggg	gcagatcagg	4260
ctcagctgct	ccagggtgaa	ctcgtgattg	atagacgagt	tactgcatac	tagccagcac	4320
gacacgtacg	tgaatgaata	aggccacaga	accagtggcc	aatataaata	ccagctcttg	4380
aaacogtga	ttttatgtac	gagtagcagc	aaatcatgca	tgcatctaca	catatatatg	4440
taacgatcga	ttttccactt	tctcatgcaa	aggcatggag	aattactatc	aatcttagtt	4500
atacgtgtat	aaaaagcggc	cgcgaattcg	atatcaagct	tatcgatacc	gtcgacctcg	4560
acctgcaggc	atgcccgctg	aaatcaccag	tctctctcta	caaatctatc	tctctctata	4620
ataatgtgtg	agtagttccc	agataaggga	attaggggtc	ttataggggt	tcgctcatgt	4680
gttgagcata	taagaaaccc	ttagtatgta	tttgattttg	taaaataactt	ctatcaataa	4740
aattttcta	tcctaaaaac	aaaatccagg	ggtaccgagc	tcgaattcta	gtctacgcgg	4800
ccgcgagctc	cagcttttgg	tccttttagt	gaggggtaat	tgccgccttg	gcgtaatcat	4860
ggctcatagct	gtttcctgtg	tgaaattggt	atccgctcac	aattccacac	aacatacgag	4920
ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctggggtg	cctaattgagt	gagctaactc	acattaattg	4980
cgttgcgctc	actgcccgtc	ttccagtcgg	gaaacctgtc	gtgccagctg	cattaatgaa	5040
tcggccaacg	cgcggggaga	ggcgggttgc	gtattgggcg	ctcttcgcgt	tcctcgccta	5100
ctgactcgct	gcgctcggtc	gttcggctgc	ggcgagcggg	atcagctcac	tcaaaggcgg	5160
taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	5220
agcaaaaggc	caggaaacgt	aaaaaggccg	cgtgtctggc	gtttttccat	aggctccgac	5280
cccctgacga	gcatacaaaa	aatcgacgct	caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	5340
tataaagata	ccaggcgttt	ccccctggaa	gtccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	5400
tgccgcttac	cggatacctg	tccgccttcc	tccttcgggg	aagcgtggcg	ctttctcata	5460
gtcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	aggctgttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	5520
acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctcgc	ccttatccgg	taactatcgt	cttgagttcca	5580
accgggtaag	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	5640
cgaggtatgt	aggcgggtgct	acagagttct	tgaagtgggtg	gcctaactac	ggctacacta	5700


```

gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 5760
gtagctottg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc 5820
agcagattac ggcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt 5880
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 5940
ggatcttcac ctatgcctt tttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat 6000
atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga 6060
tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac 6120
gggagggcct accatctggc ccagtgctg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg 6180
ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgaga agtggtcctg 6240
caactttatc cgcctccatc cagtcattta attggtgccg ggaagctaga gtaagtagtt 6300
cgccagttaa tagtttgccg aacggtgttg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgt 6360
cgatcgttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat 6420
cccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta 6480
agttggccgc agtggttatca ctcatggta tggcagcact gcataattct cttactgtca 6540
tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat 6600
agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtaaat acgggataat accgcccac 6660
atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa 6720
ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt 6780
cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg 6840
caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat 6900
attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt 6960
agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc c 7011

```

<210> 6
 <211> 746
 <212> DNA
 <213> *Triticum* sp.

```

<400> 6
agcttattac atagcaagca tggggctactc caaaacccta gtagctggcc tgttcgcaat 60
gctgttacta gctccggccg tcttgccac cgaccagac cctctccagg acttctgtgt 120
cgccgacctc gacggcaagg cggctcggg gaacgggcac acgtgcaagc ccatgtcgga 180
ggccggcgac gacttcctct tctcgtccaa gttggccaag gccggcaaca cgtccacccc 240
gaacggctcc gccgtgacgg agctcgacgt ggccgagtg cccggtagca acacgctggg 300
tgtgtccatg aaccgcgtgg actttgtcc cggaggcacc aaccaccac acatccacc 360
gcgtgccacc gagatcgga tcgtgatgaa aggtgagctt ctcgtgggaa tccttggcag 420
cctcgactcc gggaaacaagc tctactcgag ggtggtgcgc gccggagaga cgttcctcat 480
cccacggggc ctcatgact tccagttcaa cgtcggttag accgaggcct ccatggtcgt 540
ctccttcaac agccagaacc ccggcattgt ctcgtgccc ctcacgctct tcggtccaa 600
cccgcccatc ccaacgccgg tgctcaccaa ggcaactccg gtggaggcca gggctcgtga 660
acttctcaag tccaagtttg ccgctgggtt ttaatttcta ggagccttcc ctgaaatgat 720
aattatataa ttccatatat gcatgc 746

```

<210> 7
 <211> 6452
 <212> DNA
 <213> *Triticum* sp.

```

<400> 7
ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc 60
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
gatagggttg agtggtgttc cagtttgga caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240
ctaatacagt tttttgggt cgagggtccg taaagcacta aatcggaacc ctaaaaggag 300
ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa 360
agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac 420
cacaccggcc gcgttaatg cgccgtaca gggcgctcc cattcgccat tcaggctcgc 480
caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cagcagttg 600
taaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg 660
gccccccctc gagtctagaa ctagtggatc cccgacgcgg aagtggagcc gacagcccc 720

```

aggtcccaag	ccctcggcag	actagatcac	tagccctgga	tcggcgaggt	gactggatga	780
cgagcagcac	ctggtctggc	gggtgttggg	cgagtagaac	caggggagat	ggcgacgcgc	840
tgaccttctc	ccctcacccg	cgatctgctc	cttctgggtg	ggggctgcgc	gctgacgttc	900
tggtgcgggg	tgggggtcgc	cggctggcgt	tctgctgcgc	gggtggagtc	gccgaccggc	960
gtgctgctgc	taggacaatc	ggtagggcca	gtaggtgct	agccgatcga	ttggcgaaga	1020
gatccgagtc	ctggggagat	cagtgaaggc	aggtgctatt	tggcctatca	attggccagg	1080
ttctgggaac	ggggcggtggc	gtgatcaacg	aggtgctagg	ctgctagcta	gggaactgga	1140
tcttggaacg	tggaggaggc	aagtccgcta	tgctaagtac	tttaactttc	cttcttcaca	1200
tccacctgat	tcagattatt	ttgatctaaa	ttactttgca	aaaaatatat	gtgtgatata	1260
catctactat	aattgcttac	aatcaaaatt	atatgtgatt	tttttttagt	tagaagattt	1320
atatgcacag	taaatctgaa	tgttcttcac	atgcatgatt	tagtttaact	ttaaagagtt	1380
atactaacta	gtcttgataa	agagatcttt	tggagcaaca	ccaaacctcg	tgaggtgttt	1440
tgacctacgga	aagggtgtgc	tatgtaatga	ttattattag	gatcaaagtt	gtaggataaa	1500
cgtaaaacct	tctcgatgta	tcttttatac	aacattgtag	tttagttata	tatggagaga	1560
gtgatttaac	actttgtgtt	taagagtaga	ataagttatt	ccacactcta	gccaaacgaa	1620
ctattttggca	aatatctcgc	tagctggtga	gagccagagc	cgtggaaagt	ctgtcttgct	1680
attaaggcac	aagcatcaaa	caggaaacatt	tagagccatg	gaaaagtgat	gtgtcgccata	1740
ccaatgggccc	aactgctagc	gatgtaataa	tagcatccaa	gttgattttt	tatagaacat	1800
gcaaggcggt	ggcaagtggg	aaaatgattg	atcgctggca	agcttaactc	tcggaactta	1860
tagcattcaa	ctgaatcaga	acaaagatta	aaaaaaaaata	cattttccatc	gatagtgaag	1920
aattattcaa	ttgagtgaca	acgaaaatca	tattggaatg	tacatttact	tggtgatttt	1980
aaattagagg	catttttcta	ccttttttag	ttataaagat	atgcatatac	ccacccttag	2040
tgttttcgag	acaacgagag	ggcacattgc	ttttggtgct	accatctctc	tcaagcctca	2100
aataagttgt	gcggaacaga	ttatcttccc	gcgttggaat	atcggtggct	ggtagagcta	2160
gcgaaaaatc	ttccatgttg	gaatatgtcg	gcagccgat	agccgccatg	catgtaaaat	2220
ctcttttaac	tttacacttg	ctcaagtgc	actgtatgtc	gcctaccact	tgctaaatca	2280
atgggccaac	tgctagcgac	gtaatagtag	caagttgatt	tacagtgttt	tgctacagtt	2340
ctctgacttt	gtttcttcat	tttagactag	ctgactactg	tcgcttacct	gccttccctt	2400
ctccacgtta	gaggatccag	ttctgatatt	gagacctcga	cgatgggagg	aagggcgcca	2460
tcgatgtgga	gtaatttgaa	tttcaaatct	atctatctgg	ggtatattgg	tccttcaccg	2520
atggtttggg	ggctgtcgga	aattggttcc	gogactctaca	aaagtgaatg	gagggagtag	2580
ttgtttctcc	aatccgtacc	aacgcacgtg	tttctaacta	gtacttactt	ccttcgcacc	2640
acaatatgga	atagaggag	tatcgataaa	ctaacaaaga	tgattactta	cccgttttaa	2700
atgattcaag	agctcattta	atttggaact	catcatttca	tatatctttt	ttggtagaaa	2760
tgaataaaag	cagatctaga	cactagctaa	aaagtcgatg	tagccttggt	atttccttgg	2820
gccacgcggg	ccgggtgtgg	tgctccctgc	tctgtgtata	aatggagatc	aacatccaag	2880
gctctctccc	acacacacac	gctacagagc	agagcagagt	cttgctccag	tatctgcctt	2940
ctcctgcctg	cctgtagagc	atccatcacg	tgaagttcac	ggacaaaacta	cgtaacacag	3000
cagctagctc	tcgaaacctc	gctcgaaacg	cacctgcaga	tcgctctctt	cgctcgtcgc	3060
gccgcgatca	tcacacacag	ctccgtctgc	cttgagagcca	cggccgtcca	cgacgcgcgc	3120
gcctcagggt	agtcgtcgga	cgggtgtccgt	tcatttcctc	cccatttttg	taattgatta	3180
actgtttata	ctgactgacc	tcgacctgct	gaataacgtc	cgtccatggt	ttcccgcca	3240
ggcaccgccg	gggattccagc	ttattacata	cgaaagcatg	ggtactccaa	aaccctagta	3300
gctggcctgt	tcgcaatgct	gttactagct	cggccgtctt	tggccaccga	ccagaccctt	3360
ctccaggact	tctgtgtcgc	cgacctcgac	ggcaaggcgg	tctcggtgaa	cgggcacacg	3420
tgcaagccca	tgctcgaggc	cggcgacgac	ttcctcttct	cgtccaagtt	ggccaaggcc	3480
ggcaacacgt	ccaccccgaa	cggctccgcc	gtgacggagc	tcgacgtggc	cgagtggccc	3540
ggtaaccaaca	cgctgggtgt	gtccatgaac	cgcgtggact	ttgctcccg	aggcaccaac	3600
ccaccacaca	tcaccccgct	tgccaccgag	atcggcatcg	tgatgaaagg	tgagcttctc	3660
gtgggaatcc	ttggcagcct	cgactccggg	aacaagctct	actcgagggt	ggtgcgcgcc	3720
ggagagacgt	tcctcatccc	acggggcctc	atgcacttcc	agttcaacgt	cggtaagacc	3780
gaggcctoca	tggtcgtctc	cttcaacagc	cagaaccccg	gcattgtctt	cggtcccttc	3840
acgctcttcg	gctccaaccc	gcccattcca	acgcgggtgc	tcaccaaggc	actccgggtg	3900
gaggccaggg	tcgtggaact	tctcaagtc	aagtttgccg	ctgggtttta	atttctagga	3960
gacttccctg	aaatgataat	tatataatc	catatatgca	tgcttcgagg	catgcccgtg	4020
gaaatcacca	gtctctctct	actctcttat	aataatgtgt	gagtagttcc	gagtagttcc	4080
cagataaggg	aattagggtt	cttatagggt	ttcgtctatg	tggttagcat	ataagaaacc	4140
cttagtatgt	atttgtattt	gtaaaatact	tctatcaata	aaatttctaa	ttcctaaaaa	4200
caaaatccag	gggtaccgag	ctcgaattct	agtctacgcg	gccgcgagct	ccagcttttg	4260
ttccctttag	tgagggttaa	ttgcgcgctt	ggcgtaatca	tggtcatagc	tgtttccgtg	4320
gtgaaattgt	tatccgctca	caattccaca	caacatacga	gccggaagca	taaagtgtaa	4380
agcctggggt	gcctgaactg	tgagctaact	cacatttaatt	gcgttgccgt	cactgcccgc	4440
tttccagtcg	ggaaacctgt	cgtgccagct	gcattaatga	atcggccaac	gcgcggggag	4500

```

aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttctcgcgc actgactcgc tgcgctcgg 4560
cggttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacgg 4620
atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg 4680
taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggtccgc cccctgacg 4740
aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat 4800
tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttcgacc ctgccgctta 4860
gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct 4920
cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc 4980
cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtc aacccggtaa 5040
atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg 5100
tacagagttc ttgaagtggc ggcctaacta cggctacact agaaggacag 5160
ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt 5220
acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta 5280
aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc 5340
aaactcacgt taagggattt tggctcatgag attatcaaaa aggatcttca 5400
tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa 5460
cagttacca tgcctaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat 5520
catagtttgc tgaactcccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct 5580
ccccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgtcacccg gctccagatt 5640
aaaccagcca gccggaaggc ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat 5700
ccagttctatt aattggttgc ggaagctag agtaagtagt tcgccagtta 5760
caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg 5820
atccagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt 5880
agcggtttag ccttcggtc ctccgatcgt tgcagaagt aagttggccg 5940
actcatgggt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg 6000
ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc 6060
ttgtctcttg ccggcgctca tacgggataa taccgcgcca catagcagaa 6120
gtcatcattt ggaacacgtt ctccggggcg aaaactctca aggatcttac 6180
atccagtttc atgtaaccca ctctgcacc caactgatct tcagcatctt 6240
cagcgtttct gggtagcaca aaacaggaag gcaaaaagg gaataaggc 6300
gacacggaaa tggtagaata tcatactctt ctttttcaa tattattgaa 6360
gggttattgt ctcagtagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata 6420
ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc ac 6452

```

<210> 8

<211> 1939

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 8

```

ccactgtcca caggaatgt gccatctgaa acgcgttctg gaacagcgtc aggtgtatga 60
agaagaggac ccagtcgggg cgggtggaacc agaagaactt gttgctgggc tcgaccacgg 120
gtgccccctt gatgacgctc gaccggtcct ggatctccag ggccatctcc atgatgatca 180
tctctagctt ggttccaaca cacaagagga tgatgagagg gatgaaagaa acccaggtga 240
gtgtgccgat cccgtcgata tcaaggaaga gggtaggagat cgccacagcc cacagcggga 300
ggctgcgaaa agaggccaaa tgtgtcaaga tcatgcaaca aggaccagca ggggcaaaaga 360
ccatgacgca gcaaactgat agtattgtat catatggaag ctaagcaata tcatatggag 420
cctgacgaca ctctgcccga attcgattcg tgaatttcta gagaacaaaa ggtatgcac 480
aatttagaaa aaagtacact attatgtgat gtttgtttcc tatgctagtg gaacggatta 540
gaattttttt ttcatlaagg tcacctttac tggcataagc agttcacact aaacggtaaa 600
ccttatagggt gaaaattttc aggcataatat atatatatat atatatatat atgtttgatt 660
ctttccggct taacaaaata attagcaagt acttcttggt gcatttggtc caacggctga 720
atattttggc atcggtccaa gaaatccatc taaatgtttt acatttcacc aaagtgtgtg 780
tcatgacaga tgtaaacaa aataaaccga aaggagagga aggaaagagg aagataaatg 840
ttacaaaaat ttaaatcaaa cttatttcta cttttctcct tacctacca gtttaaaaa 900
acatattata ttttaaagag aggcaacatg cgccaaaggc tacccttgaa aattcctaaa 960
atattgtaca tttgactgat gaccaacaa aaagttaa atgtctcttc ttatcacatt 1020
atatttccat gcatgccttt ttctggaaac ttactatcag caaaatttag atgaaaggat 1080
aatgccacat aatttcagtc tccaagagat ttgttagttg tcatatatta aattgggtgg 1140
ccaatctatt cctgggtctt tttatgtatc tacttgacca tttgaacttc tgtagttaat 1200
tgtattctat gaatgatcac tcatccaaaa acttgttatt tgtgttttac tctgttgaat 1260
cttgaatatt tattcatatt gtatcatcata cgattggagg ccataaatag atgcttaaatg 1320

```

agagtaagat	tatcgatctc	caaacacatg	cttcttacta	gtgttgaata	tatacccttt	1380
tagatgtata	gttcaaccca	tagattcata	tgaccctcag	ctttctgatg	tgtatgtatg	1440
accttacact	gacactctga	actaatgtag	gtatcttgct	ctgcaggaat	tccggcacgag	1500
tgctgcagg	ctccatatga	tattgcttag	cttcccatatg	atacaatact	atcagtttgc	1560
tgcatcaagg	tctttggccc	tgctggctct	tgctgcatga	tcttgacaca	tttggcctct	1620
tttcgcagcc	tcccgcgtgtg	ggctgtggcg	atcctcaccc	tcttccttga	tatcgacggg	1680
atcggcacac	tcacctgggt	ttctttcatc	cctctcatca	tcctcttggt	tggttgaacc	1740
aagctagaga	tgatcatcat	ggagatggcc	ctggagatcc	aggaccgggc	gagcgtcatc	1800
aagggggcac	ccgtgggtcg	gcccagcaac	aagttcttct	ggttccaccg	ccccgactgg	1860
gtcctcttct	tcatacacct	gacgtgttc	cagaacgcgt	ttcagatggc	acatttcgtg	1920
tggacaggca	tgcgactgg					1939

<210> 9

<211> 7633

<212> DNA

<213> Triticum sp.

<400> 9

ctaaattgta	agcgttaata	ttttgttaaa	attcgcgtta	aatttttgtt	aaatcagctc	60
attttttaac	caataggccg	aaatcggcaa	aatcccttat	aaatcaaaag	aatagaccga	120
gataggggtg	agtgttggtc	cagtttgtaa	caagagtcca	ctattaaaga	acgtggactc	180
caacgtcaaa	gggcgaaaaa	cgctctatca	ggcgatggc	ccactacgtg	aaccatcacc	240
ctaatacaagt	tttttggggt	cgaggtgccg	taaagcaacta	aatcggaacc	ctaaagggag	300
cccccgattt	agagcttgac	ggggaaagcc	ggcgaaacgtg	gcgagaaagg	aagggaagaa	360
agcgaagga	gcgggcgcta	gggcgctggc	aagtgtagcg	gtcacgctgc	gcgtaaccac	420
cacaccgcc	gcgcttaatg	cgccgctaca	ggcgcgctcc	cattcgccat	tcaggctgcg	480
caactgttgg	gaagggcgat	cgggtcgggc	ctcttcgcta	ttacgccagc	tgccgaaagg	540
gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	aacgccaggg	ttttccaggt	cacgacgttg	600
taaaacgacg	gccagtgcgc	gcgcgtaata	cgactcata	tagggcgaat	tggttaccgg	660
gccccccctc	gagcttagaa	ctagtggatc	cccgacgccg	aagtggagcc	gacagcccc	720
aggtcccaag	ccctcggcag	actagatcac	tagccctgga	tcggcgaggt	gactggatga	780
cgagcagcac	ctggtctggc	gggtgttggt	cgagtagaac	cagggcgcat	ggcgacgcgc	840
tgacctctc	ccctcacccg	cgatctgctc	cttctgggtg	ggggtcgccc	gctgacgttc	900
tgttgcgggg	tgggggtcgc	cggctggcgt	tctgctgcgg	ggtgggagtc	gccgaccggc	960
gtgctgtgct	taggacaatc	ggtgaggcca	gttaggtgct	agccgatcga	ttggcgaaga	1020
gatccgagtc	ctggggagat	cagtgcggcc	aggtgctatt	tgccctatca	attggccagg	1080
ttctgggaac	ggggcggtgc	gtgatcaacg	aggtgctagg	ctgctagcta	gggaactgga	1140
tcctggaacg	tggaggaggc	aagtccggta	tgctaagtac	tttaactttc	cttcttcaca	1200
tccacctgat	tcagattatt	ttgatctaaa	ttactctgca	aaaaatatat	gtgtgatata	1260
catctactat	aattgcttac	aatcaaaatt	atatgtgatt	ttttttagtt	tagaagattt	1320
atatgcacag	taaatctgaa	gtgtcttcac	atgcatgatt	tagtttaact	ttaaagagtt	1380
atactaacta	gtcttgataa	agagatctct	tgggcaaca	ccaaacctcg	tgaggtgttt	1440
tgctacgga	aaggttgtgc	tatgtaatga	ttattattag	gatcaaagtt	gtaggataaa	1500
cgtaaaacct	tctcgatgta	tcttttatac	aacattgtag	tttagttata	tatggagaga	1560
gtgatttaac	actttgtgtt	taagagtaga	ataagttatt	ccacactcta	gccaaacgaa	1620
ctatttggca	aatatctcgc	tagctgggtg	gagccagagc	cgtggaaagt	ctgtcttgct	1680
attaaggcac	aagcatcaaa	caggaacatt	tagagccatg	gaaaagtgat	gtgtcgctca	1740
ccaatggggc	aactgctagc	gatgtaataa	tagcatccaa	gttgattttt	tatagaacat	1800
gcaaggcggt	ggcaagtggg	aaaatgattg	atcgctggca	agcttaactc	tcggaactta	1860
tagcattcaa	ctgaatcaga	acaaagatta	aaaaaaaata	catttccatc	gatagtgaag	1920
aattattcaa	ttgagtgcga	acgaaaatca	tattggaatg	tacatttaact	tggtgatttt	1980
aaattagagg	catttttcta	ccttttttag	tttaataagat	atgcataatac	ccacccttag	2040
tgttttcgag	acaacgagag	ggcacattgc	tttttggtgct	accatctctc	tcaagcctca	2100
aataagttgt	gcgacacaga	ttatcttccc	gcgttggaa	atcgtggcct	ggtagagcta	2160
gcgaaaaatc	ttccatgttg	gaatatgtcg	gcagccggat	agccgccatg	catgtaaaag	2220
ctctttttacc	tttacacttg	ctcaagtgc	actgtatgtc	gcctaccact	tgctaaatca	2280
atggggccaac	tgctagcgac	gtaatagtag	caagttgatt	tacagtgttt	tgctacagtt	2340
ctctgacttt	gtttcttcat	tttagactag	ctgactactg	tcgcttacct	gccttccctt	2400
ctccacgtta	gaggatccag	ttctgatatt	gagacctcga	cgatgggagg	aagggcgcca	2460
tcgatgtgga	ggaatttgaa	tttcaaatct	atctatctgg	ggtatattgg	tccttcaccg	2520
atgtttgggg	ggctgtcgga	aattggttcc	gcgactctaca	aaagtgaatg	gagggagtag	2580
ttgtttctcc	aatocgtacc	aacgcacgtg	tttctaacta	gtacttactt	ccttcgcacc	2640

acaatatgga	atagagggag	tatcgataaa	ctaacaaaga	tgattactta	cccggtttaa	2700
atgattcaag	agctcattta	at ttggcaact	catcatttca	tatatctttt	ttggtagaaa	2760
tgaataaaag	cagatctaga	cactagctaa	aaagtcgatg	tagccttggt	atttccttgg	2820
gccacgcggg	ccgggtgtgg	tgtccctgct	tctgtgtata	aatggagatc	aacatccaag	2880
gcctcctccc	acacacacac	gctacagagc	agagcagagt	cttgctccag	tatctgccct	2940
ctcctgcctg	cctgtagagc	atccatcacg	tgaagttcac	ggacaaacta	cgtaacacagg	3000
cagctagctc	tcgaaacctc	gctcgaaacg	cacctgcaga	tcgctctctt	cgtcgtcgtc	3060
gccgcgatca	tcatacaacag	ctccgtctgc	cttgaggcca	cggccgtcca	cgacgcgcgc	3120
gcctcaggtc	agtcgtcgga	cgggtgtccgt	tcatttctct	cccatTTTTg	taattgatta	3180
acttggtata	catgctgacc	tcgacctgct	gaataacgtc	cgtccatggt	ttcccggtcca	3240
ggcaccgccg	cccactgtcc	acacgaaatg	tgccatctga	aacgcgttct	ggaacagcgt	3300
cagggtgtatg	aagaagagga	cccagtcggg	gcgggtggaac	cagaagaact	tggtgctggg	3360
ctcgaccacg	gggtccccct	tgatgacgct	cgaccgggtcc	tggtatctcca	gggccatctc	3420
catgatgatc	atctctagct	tggttccaac	acacaagagg	atgatgagag	ggatgaaaga	3480
aaccacaggtg	agtgtgccga	tcccgctgat	atcaagggaag	aggggtgagga	tcgccacagc	3540
ccacagcggg	aggctgcgaa	aagaggccaa	atgtgtcaag	atcatgcaac	aaggaccagc	3600
aggggcaaa	agcaaacctg	agcaaacctg	tagtattgta	tcatatggaa	gctaagcaat	3660
atcatatgga	gcctgacgac	actcgtgccg	aattcgattc	gtgaatttct	agagaacaaa	3720
aggtatgcat	caatttagaa	aaaagtacac	tattatgtga	tgtttgtttc	ctatgctagt	3780
ggaacggatt	agaatttttt	tttcatttaag	gtcaccttta	ctggcataag	cagttcacac	3840
taaacggtaa	accttatagg	tgaaaatttt	caggcatata	tatatatata	tatatatata	3900
tatgtttgat	tctttccggc	tttaacaaaat	aattagcaag	tacttcttgt	tgcatTTgtt	3960
ccaacggctg	aatattattg	catcggtcca	agaaatccat	ctaaatgttt	tacatttcac	4020
caaagtgtgt	gtcatgacag	atgtaacaaa	taataaacca	aaaggagagg	aaggaaagag	4080
gaagataaat	gttacaaaaa	tttaaatcaa	acttatttct	acctttctcc	ttacctaccc	4140
agtttaaaaa	cacatattat	at ttttaaga	gaggcaacat	gcgcaaagg	ctacccttga	4200
aaattcctaa	aatattgtac	at ttgactga	tgaccaaaca	aaaagttaaa	ttgtctcttc	4260
cttatcacat	tatatattcca	tgcatgcctt	tttctggaaa	cttactatca	gcaaaattta	4320
gatgaaagga	taattgccaa	taatttcagt	ttccaagaga	tttgtagtt	gtcatatatt	4380
aaattggtgg	gccaatctat	tctgtggtct	cttctatgtat	ctacttgacc	atttgaactt	4440
ctgtagttaa	ttgtattcta	tgaatgatca	ctcatccaaa	aacttggtat	ttgtgtttta	4500
ctctgttgaa	tcttgaatat	ttattcattt	tgttcatcat	acgattggag	gcccataata	4560
gatgcttaat	gagagtaaga	ttatcgatct	ccaaacacat	gcttcttact	agtgttgaat	4620
atataccctt	ttagatgtat	agttcaaccc	atagattcat	atgaccctca	gctttctgat	4680
gtgtatgtat	gaccttacac	tgacactctg	aactaatgta	ggtatcttgt	cctgcaggaa	4740
ttcggcacga	gtgtcgtcag	gctccatatg	atattgctta	gcttccatat	gatacaatac	4800
tatcagtttg	ctgcgtcatg	gtctttgccc	ctgctgggtcc	ttgttgcatg	atcttgacac	4860
at ttggcctc	ttttcgagc	ctcccgctgt	gggctgtggc	gatcctcacc	ctcttccctg	4920
at atcgacgg	gatcggcaca	ctcacctggg	tttctttcat	ccctctcatt	atcctcttgt	4980
gtgttggaac	caagctagag	atgatcatca	tggagatggc	cctggagatc	caggaccggg	5040
cgagcgtcat	caagggggga	cccggtggtg	agccagcaa	caagttcttc	tggttccacc	5100
gccccgactg	ggtctctctc	ttcatacacc	gcacgtgttt	ccagaacgcg	tttcagatgg	5160
cacatttctg	gtggacaggc	atgcgactgg	geatgccgcg	tgaaatcaac	agtctctctc	5220
tacaaatcta	tctctctcta	taataatgtg	tgagtgttcc	ccagataagg	gaattagggg	5280
tcttataggg	tttcgctcat	gtgttgagca	tataagaaac	ccttagtatg	tatttgtatt	5340
tgtaaaatac	ttctatcaat	aaaatttcta	attcctaaaa	ccaaaatcca	ggggtagcca	5400
gctcgaattc	tagtctacgc	ggccgcgagc	tccagctttt	gttcccttta	gtgaggggta	5460
attgcgcgct	tggcgtaatc	atggctcatg	ctgtttcctg	tgtgaaattg	ttatccgctc	5520
acaattccac	acaacatacg	agccggaagc	ataaaagtga	aagcctgggg	tgctaagtga	5580
gtgagctaac	tcacattaat	tgcggttgcc	tcactgcccg	ctttccagtc	gggaaacctg	5640
tcgtgccagc	tgcattaatg	aatcggtcaa	cgcgcgggga	gaggcggttt	gcgtattggg	5700
cgctcttccg	cttcctcgct	cactgactcg	ctgcgctcgg	tcgttcggct	gcggcgagcg	5760
gtatcagctc	actcaaaggc	ggtaatacgg	ttatccacag	aatcagggga	taacgcagga	5820
aagaacatgt	gagcaaaagg	ccagcaaaag	gccaggaacc	gtaaaaaggc	cgcgttgctg	5880
gcgtttttcc	ataggctccg	ccccctgac	gagcatcaca	aaaatcgacg	ctcaagtctg	5940
aggtggcgaa	acccgacagg	actataaaga	taccaggcgt	ttccccctgg	aagctccctc	6000
gtgcgctctc	ctgttccgac	cctgcgcgtt	accggatacc	tgctccgctt	tctcccttgc	6060
ggaagcgtgg	cgctttctca	tagctcacgc	tgtaggatct	tcagttcggt	gtaggtcggt	6120
cgctccaagc	tgggctgtgt	gcacgaaccc	cccgttcagc	ccgaccgctg	cgccttatcc	6180
ggtaaactatc	gtcttgagtc	caaccgcgga	agacacgaet	tatcgccaat	ggcagcagcc	6240
actggttaaca	ggattagcag	agcgaggatg	gtaggcggtg	ctacagagtt	cttgaagtgg	6300
tggcctaact	acggctacac	tagaaggaca	gtatttggtg	tctgcgctct	gctgaagcca	6360
gttaccttgc	gaaaaagagt	tggtagctct	tgatccggca	aacaaaccac	cgctggtagc	6420

10/11

```

gggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat 6480
cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt 6540
ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt 6600
tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggctctg acagttacca atgcttaatc 6660
agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc 6720
gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata 6780
ccgcgagacc caogctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg 6840
gccgagcgca gaagtgggtcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc 6900
cggaagacta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct 6960
acaggcatcg tgggtgcacg ctcgctgctt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa 7020
cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctccttcggt 7080
cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca 7140
ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tgggtgagtac 7200
tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgctca 7260
atacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt 7320
tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc 7380
actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca 7440
aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgata 7500
ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc 7560
ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc 7620
cgaaaagtgc cac 7633

```

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Adaptor-Primer

<400> 10

atatatctgc agggagccac ggccgtccac

30

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Adaptor-Primer

<400> 11

tatcccgggc ccgtgcctgg acgggaa

27

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Adaptor-Primer

<400> 12

atatatctcg agtctagaac tagtgatcc

30

<210> 13

<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Adaptor-Primer

<400> 13
atatattacg tagtttgtcc gtgaacttca

30

<210> 14
<211> 41
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 14
gtacacaggc agctagctct cgaaacctcg ctcgaaacgc a

41

<210> 15
<211> 41
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 15
catgtgtcgc tcgatcgaga gctttggagc gagctttgcg t

41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/EP2004/011214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/82				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	MAUCH F. ET AL: "differential induction of distinct glutathione-S-transferase of wheat by xenobiotics and pathogen attack" PLANT PHYSIOL, vol. 102, 1993, pages 1193-1201, XP002313139	1-26		
A	XU F. ET AL: "tandemly duplicated safener induced glutathione s-transferase genes from triticum tauschii contribute to genome and organe-specific expression in hexaploid wheat" PLANT PHYSIOL, vol. 130, 2002, pages 362-373, XP002313140	1-26		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents :				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family </td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">12 January 2005</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">01/02/2005</div>		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Keller, Y</div>		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.